

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

A1

3) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 3. August 1995 (03.08.95)

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Januar 1995 (27.01.95)

(30) *Prioritätsbest.:
P 44 02 569.6
28. Januar 1994 (28.01.94)*

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist, Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(71)772) Anmelde und Erfinder: ALTMANN, Herbert [D/DE]
Stemstrasse 7, D-82110 Gerneding (DE), WENDLER
Wolfgang [D/DE]; Ringstrasse 25, D-81375 München
(DE).

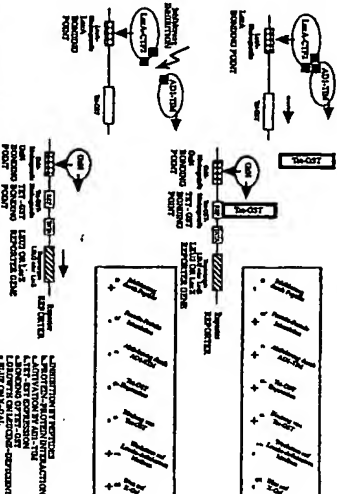
(74) **Anschrift:** DIEHL, Hermann, O., Th. usw.: Flöggengasse 13
D-80639 München (DE).

(34) Title: METHOD OF DETERMINING THE ACTIVITY OF A REGULATORY FACTOR, AND USE OF THE METHOD

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT EINES REGULATORISCHEN FAKTORS SOWIE VERWENDUNG DIESES VERFAHRENS

Repression der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen I κ B α -CTF2 und ABL1-TYM im Repressor-abhängigen Verfahren

LEAD-CITY AND ARI-TON IN THE EXPRESSION-DEPENDING PHASE



Die Befragung betrifft ein Verhalten zur Bekämpfung der Aktivität eines regulatorischen Faktors, die über das Reportersystem nachweisbar ist. Hierzu werden Gegenstände für einen ersten und zweiten regulatorischen Faktor sowie für die Aktivität oder Expression des zweiten regulatorischen Faktors zur Verfügung gestellt. Der aktive erste regulatorische Faktor wirkt auf die Aktivität oder Expression des zweiten regulatorischen Faktors ein, der letztere wiederum wirkt auf das Reportersystem ein. Nachfolgend wird das Reportersystem durch einen ersten und zweiten regulatorischen Faktor angeregt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfzügen der Schriften, die internationalen Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlicht.

AT	Austria	Österreich	ÖA	Österreich	ÖA
AU	Australia	Australien	ÖA	Österreich	ÖA
BE	Belgium	Belgien	CH	Österreich	ÖA
BF	Burkina Faso	Haute Volta	CH	Österreich	ÖA
BG	Bulgaria	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ
BJ	Benin	Benin	IL	Israel	PL
BR	Brazil	Brasilien	JP	Japan	PT
BY	Belarus	Belarus	RU	Russland	RO
CA	Canada	Kanada	RU	Russland	RU
CH	Switzerland	Schweiz	DE	Deutschland	DE
CO	Colombia	Kolumbien	DE	Deutschland	DE
CR	Costa Rica	Kosta Rica	DE	Deutschland	DE
CZ	Czechia	Čechy	DE	Deutschland	DE
DE	Germany	Deutschland	DE	Deutschland	DE
DK	Denmark	Dänemark	DE	Deutschland	DE
ES	Spain	Spanien	DE	Deutschland	DE
FI	Finland	Finnland	DE	Deutschland	DE
FR	France	Frankreich	DE	Deutschland	DE
GB	Great Britain	Großbritannien	DE	Deutschland	DE
GR	Greece	Griechenland	DE	Deutschland	DE
GU	Guam	Guam	DE	Deutschland	DE
HN	Honduras	Honduras	DE	Deutschland	DE
HU	Hungary	Ungarn	DE	Deutschland	DE
IE	Ireland	Irland	DE	Deutschland	DE
IL	Israel	Israel	DE	Deutschland	DE
IN	India	Indien	DE	Deutschland	DE
JP	Japan	Japan	DE	Deutschland	DE
KR	Korea	Südkorea	DE	Deutschland	DE
LT	Lithuania	Litauen	DE	Deutschland	DE
LU	Luxembourg	Luxemburg	DE	Deutschland	DE
LV	Latvia	Lettland	DE	Deutschland	DE
MC	Monaco	Monaco	DE	Deutschland	DE
MD	Moldova	Moldau	DE	Deutschland	DE
ME	Montenegro	Montenegro	DE	Deutschland	DE
ML	Mali	Mali	DE	Deutschland	DE
MN	Mongolia	Mongolei	DE	Deutschland	DE
MT	Malta	Malta	DE	Deutschland	DE
MY	Malaysia	Malaysia	DE	Deutschland	DE
NL	Netherlands	Niederlande	DE	Deutschland	DE
NO	Norway	Norwegen	DE	Deutschland	DE
NZ	New Zealand	Neuseeland	DE	Deutschland	DE
PA	Panama	Panama	DE	Deutschland	DE
PE	Peru	Peru	DE	Deutschland	DE
PL	Poland	Polen	DE	Deutschland	DE
PT	Portugal	Portugal	DE	Deutschland	DE
RO	Romania	Rumänien	DE	Deutschland	DE
RU	Russia	Russland	DE	Deutschland	DE
SE	Sweden	Schweden	DE	Deutschland	DE
SI	Slovenia	Slowenien	DE	Deutschland	DE
SK	Slovakia	Slowakei	DE	Deutschland	DE
SP	Spain	Spanien	DE	Deutschland	DE
TD	Togo	Togo	DE	Deutschland	DE
TH	Thailand	Thailand	DE	Deutschland	DE
TR	Turkey	Türkei	DE	Deutschland	DE
UA	Ukraine	Ukraine	DE	Deutschland	DE
US	United States	USA	DE	Deutschland	DE
UZ	Uzbekistan	Usbekistan	DE	Deutschland	DE
VN	Vietnam	Vietnam	DE	Deutschland	DE

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität eines regulatorischen Faktors sowie Verwendung dieses Verfahrens

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von regulatorischen Faktoren, wobei diese Aktivität über die Aktivität eines Reportersystems nachweisbar ist.

10 In lebenden Zellen werden Stoffwechselleistungen entweder kontinuierlich oder aber nur in bestimmten Entwicklungsphasen bzw. auf Grund äußerer Signale hin erbracht. Bei der durch Hormone vermittelten Signalübertragung etwa werden die entsprechenden Signale über Wechselwirkungen zwischen Proteinen von der äußeren Zellmembran in das Zellinnere hinein transportiert um dort, beispielsweise im Zellkern, in eine Anforderung zur Teilung umgesetzt zu werden. Werden diese Wechselwirkungen gestört, kann dies eine gesunde Zelle aus dem Gleichgewicht bringen und zu Wachstumsstörungen führen. So kann z.B. eine entartete Zelle zu einem Krebsgeschwür heranwachsen und über die Bildung von Metastasen den todtbringenden Tumor über den gesamten Körper verteilen. Auch Viren wie HIV (Human Immunodeficiency Virus) oder HPV (Human Papilloma Virus) greifen in die natürlichen Abläufe der Zelle ein und mißbrauchen sie dazu, sich zu vervielfältigen um dann weitere Zellen zu infizieren.

Es ist offensichtlich, daß über solche Wechselwirkungen gezielt in das Geschehen einer Zelle eingegriffen werden kann, sofern die entsprechenden Proteine bekannt und einem einfachen Test zugänglich sind. In den vergangenen Jahren sind derartige Tests entwickelt worden. Sie beruhen letztlich darauf, daß eine einfache biochemische Reaktion, die durch eine Farbreaktion nachweisbar und vieleausendfach gleichzeitig durchführbar ist, von einer solchen Wechselwirkung zwischen Proteinen abhängig gemacht wird. Sogenannte in vivo Assays lassen diese Wechselwirkungen z.B.

in Hefezellen nachweisen, die leicht zu züchten und auch für die Bildung menschlicher Proteine geeignet sind (Brent, R. et al., PCT-Veröffentlichung WO 92/05286; Fields, S. et al., U.S. 5,283,173).

Die Transkription proteinkodierender Gene wird von einem Multiproteinkomplex bestehend aus Pol II und einer Reihe spezifischer und genereller Transkriptionsfaktoren initiiert. Eine Vielzahl dieser Faktoren ist in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert worden, wodurch man erste Einblicke in die Mechanismen der eukaryontischen Genexpression erhalten hat (Zawel et al., Curr. Opin. Cell. Biol. (1992) 4, S. 488-495; Cortes et al., Mol. Cell. Biol. (1992) 12, S. 413-421; Flores et al., J. Biol. Chem. (1992) 267, S. 2786-2793).

Neben der basalen Transkriptionsmaschinerie spielen vor allem die DNA bindenden Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der stimulierten Genexpression.

Die drei charakteristischen Merkmale von Transkriptionsaktivatoren, wie proto-Onkogene oder virale Transkriptionsfaktoren und Protein-Protein-Wechselwirkungen in Signalketten oder Multiproteinkomplexen, welche sie zu besondere geeigneten Targets für Untersuchungen machen, sind ihre hohe Diversität, ihre Spezifität sowie ihre mögliche Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. So sind z.B. mehr als 300 genspezifische Transkriptionsfaktoren bis heute beschrieben und es wird angenommen, daß ca. 3000 weitere derartige Faktoren vom menschlichen Genom kodiert werden. Ähnlich wie Rezeptoren an der Zelloberfläche gleicht praktisch kein Faktor und keine Protein-Protein Wechselwirkung genau der anderen. Jedes Protein bietet eine einzigartige Oberflache und stellt dadurch ein einzigartiges Target dar.

Die DNA-bindende und die stimulierende Aktivität müssen jedoch nicht auf einer Polypeptidkette lokalisiert vorliegen (Weston et al., Cell (1989) 58, S. 85-93). Die Teilung dieser beiden Eigenschaften erlaubt zum Beispiel die Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen X und Y, wobei der DNA-bindende Teil auf einem Protein X und der transkriptionsaktive Teil auf einem Protein Y lokalisiert sind (Fields et al., Nature (1989) 340, S. 245-246). Die spezifische Inhibierung dieser Interaktion resultiert im Verlust der stimulierenden Aktivität dieses Elements.

Bisher sind Verfahren bekannt, um Inhibitoren nachzuweisen, welche die biologische Aktivität von Oncoproteinen hemmen (WO 92/05286). Diese Verfahren werden eingesetzt, um inhibitorische Komponenten zu identifizieren und klassifizieren, indem die Fähigkeit einer solchen Komponente untersucht wird, die Expression von Reportergenen zu beeinflussen. Nach der vorgenannten PCT-Veröffentlichung werden zur Durchführung dieses Verfahrens Fusionsgene bereitgestellt, welche für Fusionsproteine codieren. Diese Fusionsproteine binden an eine Bindestelle auf der DNA, wobei diese DNA für die Reportergene codiert, und vermitteln so die Expression des Reportergens. Wird die Expression des Reportergens untersucht, so ist eine Abnahme der Reportergen-Expression indikativ für eine Komponente, welche die Aktivität der Fusionsproteine hemmt.

Der Nachweis von Inhibitoren erfolgt bei Anwendung der genannten Verfahren ausschließlich über eine Abnahme der Expression der betreffenden Reportergene, d.h. es handelt sich um einen Negativnachweis. Das bekannte Nachweisystem ist insofern von Nachteil, da es gegebenenfalls die Empfindlichkeit eines Testsystems herabsetzt. Wird z.B. ein Reportergen prinzipiell nur schwach exprimiert, so sind nach Inhibitorzugabe und somit noch weiter abnehmender Expression häufig keine eindeutigen Aussagen möglich. Diese Nachteile

gehen darauf zurück, daß eine zugesetzte inhibitorische Komponente einen Transkriptionsfaktor hemmt, der die Expression von Reportergenen beeinflusst, d.h. es handelt sich um eine direkte funktionelle Verbindung von Inhibitor und Reportergen. Insbesondere ist eine fehlende Expression nach Inhibitorzugabe von Nachteil, da Versuchsdurchführungen häufig auf Selektion von Organismen beruhen, wie im folgenden kurz erläutert. Wird so z.B. das Wachstum von Zellen nach Inhibitorzugabe untersucht, wachsen gerade die zu untersuchenden gehemmten Zellen nicht und müssen über weitere Versuche nachgewiesen werden. Ein Screening vieler verschiedener potentieller Inhibitoren ist daher nicht möglich. Die fehlende Expression von Reportergenen nach Inhibitorzugabe kann darüber hinaus auch auf die Einnahme weiterer Faktoren zurückzuführen sein, beispielsweise des Inhibitors auf Faktoren der Translations- und Replikationsmechanismen sowie des Zellzyklus. Somit ist der Wirkungsort des Inhibitors häufig nicht klar zu definieren, woraus eine mangelnde Spezifität der bisherigen Nachweisysteme resultiert.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die vorgenannten Nachteile nicht aufweist, das schnelle, eindeutige und spezifische Aussagen über Testergebnisse ermöglicht sowie die Empfindlichkeit von Testsystemen verbessert.

Die Erfindung löst diese Aufgabe durch das im unabhängigen Patentanspruch 1 angegebene Verfahren und die Verwendung nach Patentanspruch 63. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen, Aspekte und Details des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den abhängigen Patentansprüchen 2 bis 62 sowie 64 und 65, den Zeichnungen, Tabellen und den bevorzugten Ausführungsformen dargelegt. Die vorliegende Erfindung stellt ein wesentlich verbessertes Nachweisystem für die Aktivität eines regulatorischen Faktors zur Verfügung. Mit dem angegebenen

Verfahren kann auch im lebenden Organismus eine inhibitorische Komponente durch Expression bzw. verstärkte Expression eines Reportersystems nachgewiesen werden, ohne daß die Nachteile bekannter Verfahren auftreten.

Damit wird die Empfindlichkeit des Testsystems entscheidend erhöht und ermöglicht das Screenen von Inhibitorbibliotheken großer Komplexität (über 10^9 verschiedene Moleküle).

Hiermit wird ein neues Prinzip zum Screenen nach Inhibitoren und Chemikalien, die entsprechende Aktivitäten modifizieren, eingesetzt. Der Assay kann auch zur Identifizierung bislang unbekannter Wechselwirkungen verwendet werden.

Wesentlich für das erfindungsgemäße Verfahren ist das Bereitstellen mindestens eines zweiten regulatorischen Faktors. Das im folgenden beschriebene Verfahren wird bevorzugt in Wirtsorganismen durchgeführt, wodurch jedoch nicht ausgeschlossen werden soll, entsprechende Verfahren auch außerhalb eines Organismus durchzuführen. Als Wirtsorganismen werden Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, oder eukaryotische Zellen, insbesondere Hefen, eingesetzt. Besonders bevorzugt sind der Bakterienstamm *Escherichia coli* oder der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden, wie vorstehend erwähnt, bevorzugt in einem Wirtsorganismus, mindestens ein Reportersystem mit mindestens einer ersten Genanordnung, welche mindestens ein Reportergen aufweist, bereitgestellt. Die Expression der Reportergene dient als Nachweisystem.

Des weiteren wird mindestens ein erster regulatorischer Faktor bzw. die entsprechende Genanordnung bereitgestellt. Gemäß der vorliegenden Erfindung beeinflusst der mindestens eine erste regulatorische Faktor einen oder mehrere zweite regulatorische Faktoren und nicht direkt die Aktivität des

Reportersystems, wodurch es erstmals ermöglicht wird, die Aktivität eines ersten regulatorischen Faktors durch ein positives Signal nachzuweisen.

Der mindestens eine zweite regulatorische Faktor wird durch mindestens eine zweite Genanordnung codiert. Aus Gründen der Vereinfachung wird bei den bereits erwähnten und den im folgenden genannten, am Verfahren beteiligten Komponenten nicht immer ausdrücklich erwähnt, daß sowohl eine als auch mehrere Komponenten wie Gene, Genanordnungen, regulatorische Faktoren, Proteine usw., beteiligt sein können. Es soll jedoch so ausgelegt werden, daß diese Möglichkeiten eingeschlossen sind. Bevorzugt wird die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors durch den ersten regulatorischen Faktor beeinflusst. Über eine Wechselwirkung des zweiten regulatorischen Faktors mit Komponenten des Reportersystems wird auch Einfluß auf die Aktivität des Reportersystems genommen. Somit wird gemäß der vorliegenden Erfindung die Aktivierung des Reportersystems durch Zugabe einer inhibitorischen Komponente über das Zusammenwirken der ersten und zweiten regulatorischen Faktoren nachgewiesen.

Der erste regulatorische Faktor enthält eine oder mehrere regulierende Komponenten. Enthält der erste regulatorische Faktor mehrere regulierende Komponenten, ist insbesondere die zusammenge setzte Form die aktive Form. Bei den ein oder mehreren regulierenden Komponenten handelt es sich häufig um ein oder mehrere regulierende Proteine. Die regulierenden Proteine sind bevorzugt ein oder mehrere Transkriptionsregulatoren, beispielsweise Transkriptionsfaktoren. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Transkriptionsfaktor nur ein Protein.

Gemäß einer weiteren, bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält der Transkriptionsregulator mindestens zwei Hybridproteine,

Insbesondere zwei Hybridproteine, welche von einer bereitgestellten dritten Genanordnung codiert werden.

5 Die Hybridproteine sind bevorzugt ein erstes Hybridprotein, welches ein Fusionsprotein aus einer DNA-Bindedomäne und einer ersten Proteinkomponente ist, und ein zweites Hybridprotein, welches ein Fusionsprotein aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist. Durch Bindung zwischen den beiden Proteinkomponenten, die auch Targets genannt werden, entsteht der aktive Transkriptionsregulator.

10 Die regulierenden Komponenten des ersten regulatorischen Faktors sind gemäß dem vorliegenden Verfahren nicht auf regulierende Proteine beschränkt. So kann beispielsweise der erste regulatorische Faktor Nucleinsäuren oder auch weitere Komponenten enthalten.

15 Die Aktivität des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors wird durch inhibitorische Komponenten beeinflusst. Diese inhibitorischen Komponenten sind bevorzugt Naturstoffe wie Peptide, Nucleinsäuren und Kohlenhydrate oder niedermolekulare Substanzen oder andere chemische Substanzen oder auch durch Mutagenese veränderte Bestandteile des ersten regulatorischen Faktors.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine vierte Genanordnung für die Expression von Peptiden bereitgestellt. Diese Peptide weisen insbesondere eine inhibitorische Aktivität auf. So können in vivo synthetisierte Peptidbibliotheken zur Inhibierung von regulatorischen Faktoren eingesetzt werden. In weiteren bevorzugten Ausgestaltungen werden beliebige Kombinationen der genannten Inhibitoren zugesetzt.

35

Besonders wichtig ist die Einwirkung der inhibitorischen Komponenten auf die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors durch Einwirkung auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei regulatorischen Komponenten, die in dem ersten regulatorischen Faktor enthalten sind. Diese Einwirkung ist bevorzugt eine Hemmung der Wechselwirkung der regulatorischen Komponenten. Die Aktivität kann auch aufgrund mehrerer Komponenten, z.B. in einem Multiproteinkomplex, reguliert werden. Dieser Komplex ist solange aktiv, wie einzelne oder mehrere Bausteine diesen Komplex bilden. Erst die Inhibierung einer oder mehrerer dieser Komponenten zerstört die Aktivität des gesamten Komplexes. Auch vom bisher Beschriebenen abweichende Aktivitäten, die in irgendeiner Weise die Expression des zweiten regulatorischen Faktors aktivieren, sind als erster regulatorischer Faktor geeignet. Die Inhibierung des ersten regulatorischen Faktors kann sowohl die Aktivität des Transkriptionsregulators und/oder die Generierung des Transkriptionsregulators betreffen. Insbesondere wird die Wechselwirkung zwischen zwei regulierenden Proteinen des ersten regulatorischen Faktors gehemmt. Wird eine der genannten Wechselwirkungen gehemmt, liegt ein inaktiver oder in seiner Aktivität herabgesetzter erster regulatorischer Faktor vor. Infolgedessen ist die Interaktion des ersten regulatorischen Faktors mit dem zweiten regulatorischen Faktor gehemmt oder herabgesetzt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Wechselwirkung zwischen dem ersten regulatorischen Faktor und dem zweiten regulatorischen Faktor beeinflusst. Auch diese Einwirkung ist besonders bevorzugt eine Hemmung. In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform beeinflusst der Inhibitor die Wechselwirkung des ersten regulatorischen Faktors mit Genabschnitten der zweiten Genanordnung. In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens modifiziert der mindestens eine erste regulatorische Faktor, der bevorzugt ein oder mehrere Proteine enthält, den mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor,

35

beispielsweise über Kinasierung, Dophosphorylierung, Spaltung, Umfaltung oder Konformationsänderung.

5 Wird kein Inhibitor zugesetzt, liegt der erste regulatorische Faktor insbesondere in der aktiven Form vor und wirkt auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors ein. Es ist des weiteren bevorzugt, daß der erste regulatorische Faktor mit DNA-Abschnitten der für den zweiten regulatorischen Faktor codierenden zweiten Genanordnung wechselwirkt und somit die Expression des zweiten regulatorischen Faktors beeinflusst.

10 Die Zugabe einer inhibitorischen Komponente beeinflusst beispielsweise die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten, welche gemeinsam den ersten regulatorischen Faktor bilden. In einer weiteren Ausführungsform wirkt die Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors ein, unabhängig davon, ob er eine oder mehrere regulierende Komponenten enthält. Die Einwirkung auf die Aktivität betrifft beispielsweise die transkriptionsaktivierende oder bindende Aktivität des ersten regulatorischen Faktors oder die Interaktion des ersten und zweiten regulatorischen Faktors.

20 In einer weiteren Ausführungsform beeinflusst die Zugabe einer inhibitorischen Komponente sowohl die genannte Wechselwirkung als auch die genannte Aktivität. Die Einwirkung ist bevorzugt eine Hemmung der Wechselwirkung und/oder der Aktivität.

25 Durch Zugabe der inhibitorischen Komponente wird bevorzugt die Wechselwirkung zwischen dem ersten regulatorischen Faktor und einem DNA-Abschnitt der zweiten Genanordnung, welche den zweiten regulatorischen Faktor codiert, wobei es sich insbesondere um eine Hemmung handelt, beeinflusst. Die Einwirkung bzw. die Hemmung der oben genannten Wechselwirkungen durch inhibitorische Komponenten führt zu einer Einwirkung auf die Genexpression der zweiten

5 Genanordnung, insbesondere zu einer Hemmung der Genexpression der zweiten Genanordnung. Besonders bevorzugt führt die Zugabe der inhibitorischen Komponente über eine Hemmung der Aktivität des regulierenden Proteins zu einer Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung.

10 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird durch die Zugabe einer inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten eingewirkt, wobei eine dieser Komponenten eine regulatorische Komponente ist oder eine regulatorische Komponente enthält.

15 Vorteilhaft ist, wenn diese regulatorische Komponente eine Proteinkomponente ist oder mindestens eine Proteinkomponente enthält. Bevorzugt sind bei den Proteinkomponenten Fusionsproteine.

20 Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung ist die regulatorische Komponente eine inhibitorische Komponente.

25 Die mindestens eine zweite Komponente ist beispielsweise eine Proteinkomponente oder enthält eine Proteinkomponente. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß diese Proteinkomponente ein Fusionsprotein ist.

30 Bei den zweiten Proteinkomponenten handelt es sich insbesondere um Proteinkomponenten, die Verankerungsfunktionen besitzen. Bevorzugt erfolgt die Verankerung der miteinander wechselwirkenden Proteinkomponenten im Cytoplasma. Als vorteilhaft hat sich auch die Verankerung der miteinander in Wechselwirkung stehenden Proteine über die Verankerungsfunktion der zweiten Proteinkomponente in der Membran erwiesen.

Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform erfolgt über die Zugabe einer inhibitorischen Komponente eine Hemmung der Wechselwirkung zwischen den mindestens zwei Komponenten die Freisetzung der mindestens einen ersten Komponente, welche den inhibitorisch wirkenden Abschnitt enthält. Diese freigesetzte erste Komponente interagiert mit dem transkriptionsaktivierenden Faktor der Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor. Besonders bevorzugt wird der transkriptionsaktivierende Faktor durch den freigesetzten inhibitorisch wirkenden Faktor gehemmt, wodurch eine Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung erfolgt.

In den bisher und auch im folgenden genannten Ausführungsformen enthalten die regulatorischen bzw. interagierenden Komponenten Abschnitte, die die regulatorische bzw. interagierende Funktionen bedingen. Die entsprechenden Proteinabschnitte können eine oder mehrere Abschnitte oder Domänen beinhalten. Diese Abschnitte oder Domänen können sich in verschiedenen Regionen eines Proteins bzw. auf verschiedenen Proteinen befinden.

Vorzugsweise werden die mindestens zwei Proteinkomponenten von einer fünften Genanordnung codiert.

Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente einen Abschnitt, der mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente wechselwirkt, einen Abschnitt, der mit einem Transkriptionsfaktor wechselwirkt sowie einen inhibitorischen Abschnitt enthält, wobei erst nach Hemmung der Wechselwirkung der Bindung zwischen den mindestens zwei Proteinkomponenten die inhibitorisch wirkende zweite Proteinkomponente die Expression des zweiten regulatorischen Faktors hemmt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung ist die mindestens eine erste regulatorische Komponente ein

Transkriptionsregulator oder Transkriptionsfaktor des zweiten regulatorischen Faktors, der nach Inhibierung der Wechselwirkung mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente in seiner Aktivität reduziert oder inaktiviert wird, wodurch eine Inhibierung oder Reduzierung der Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors erfolgt.

Bei den zweiten regulatorischen Faktoren handelt es sich insbesondere um Proteine, beispielsweise, je nach Versuchsanordnung, um mindestens einen Repressor oder um mindestens eine Rekombinase. Die aktiven zweiten regulatorischen Faktoren wirken über eine Wechselwirkung mit Komponenten des Reportersystems auf die Aktivität des Reportersystems ein. Der zweite regulatorische Faktor bindet bevorzugt an DNA-Abschnitte des Reportersystems.

Ein Repressor, codiert durch die zweite Genanordnung, ist ein Beispiel für einen zweiten regulatorischen Faktor. Dieser Repressor beeinflusst die Expression mindestens eines Reportersystems, indem er bevorzugt an Komponenten des Reportersystems bindet. Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Bindung des Repressors an Komponenten des Reportersystems durch weitere Agenzien reguliert. So induziert beispielsweise das Antibiotikum Tetracyclin eine Ablösung eines prokaryotischen Repressors von der DNA. Ein aktiver Repressor hemmt die Expression mindestens eines Reportersystems. Wird dagegen, zum Beispiel durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression des Repressors gehemmt, erfolgt die Expression mindestens eines Reportersystems.

Eine Rekombinase, codiert durch die zweite Genanordnung, ist ein weiteres Beispiel für einen zweiten regulatorischen Faktor. In einer entsprechenden Versuchsanordnung enthalten die Reportersysteme Rekombinationselemente. Liegt ein aktiver

13

erster regulatorischer Faktor vor, eliminiert oder invertiert die Rekombinase über Rekombinationsprozesse mindestens ein Reporter. Hierbei interagiert die Rekombinase mit den spezifischen, das Reporter-Gen bzw. die Reporter-Gen flankierende Rekombinationselemente und eliminiert oder invertiert das Reporter-Gen, welches von den Rekombinationselementen flankiert wird. Sowohl nach einer Elimination als auch nach Invertierung wird das Reporter-Gen nicht exprimiert. Ist also kein Inhibitor dem Versuchsaussatz zugesetzt worden, liegt ein aktiver erster regulatorischer Faktor vor, der bevorzugt die für einen zweiten regulatorischen Faktor codierenden Gene aktiviert, insbesondere über Wechselwirkung mit DNA-Abschnitten. Der zweite aktive Faktor, wie z.B. ein Repressor oder eine Rekombinase, hemmt die Expression der Reporter-Gene.

Durch die Beeinflussung der Wechselwirkung von mindestens zwei regulatorischen Komponenten des Transkriptionsregulators, wobei die regulatorischen Komponenten insbesondere zwei Hybridproteine sind, wird in einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reporter-Gens erfolgt. Durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators (bzw. anderer regulatorischer Faktoren des Transkriptionsregulators) wird die Expression der Rekombinase insbesondere gehemmt und es erfolgt eine Expression des mindestens einen Reporter-Gens.

Besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform, bei der durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reporter-Gens erfolgt.

14

Inbesondere wird durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression des Repressor-Gens gehemmt und eine Expression des mindestens einen Reporter-Gens erfolgt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reporter-Gens erfolgt.

Besonders bevorzugt wird durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression der Rekombinase gehemmt und eine Expression des mindestens einen Reporter-Gens erfolgt.

Die Versuche basieren darauf, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen mindestens ein Genprodukt des mindestens einen Reporter-Gens nachweisbar ist.

Gemäß bevorzugter Ausführungsformen wird ein Genprodukt eines Reporter-Gens oder werden mehrere Genprodukte mehrerer Reporter-Gene exprimiert. In einer weiteren Ausgestaltung werden je nach variierenden Versuchsbedingungen ein bis mehrere Reporter-Gene exprimiert.

Der Nachweis des Genprodukts bzw. der Genprodukte erfolgt dann beispielsweise über eine oder mehrere Veränderungen des Phänotyps von Wirtszellen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das Genprodukt des Reporter-Gens Zellwachstum der Wirtszellen in Mangemedium. Das Genprodukt z.B. des Reporter-Gens *leu2* ermöglicht Zellwachstum in Leucin-defizientem Medium. Bei einer weiteren vorteilhaften Abwandlung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Hebestämme mit chromosomalen Mutationen als Wirtszellen eingesetzt, die beispielsweise zu Leucin-Defizienzen bei der Verstoffwechselung der Aminosäure Leucin führen. Die

15

Chromosomalen Mutationen können auch zu Defizienzen bei der Verstoffwechselung der Aminosäuren Tryptophan und Histidin führen. Gegebenenfalls ist auch der Einsatz proteasedefizienter Hefen sinnvoll.

5 Es ist auch bevorzugt, Genanordnungen bereitzustellen, die für ein oder mehrere Genprodukte codieren, wobei diese Genprodukte Substrate in einer meßbaren Farbreaktion umsetzen können, wie z.B. das Reportererzsystem LacZ. Das Genprodukt dieses Reportergens, die β -Galactosidase, reagiert mit verschiedenen Substraten in einer sichtbaren Farbreaktion.

15 Die für das vorliegende Verfahren genannten Genanordnungen können auf verschiedenen Vektoren oder demselben Vektor angeordnet sein. Als Vektoren werden insbesondere Plasmide verwendet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind ein oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Genanordnungen, oder eine oder mehrere Genanordnungen, ins Wirtsgenom integriert.

20 Gemäß der vorliegenden Erfindung wird also durch Einsatz einer oder mehrerer inhibitorischer Komponenten zunächst die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors beeinflusst, wobei dieser wiederum auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors einwirkt.

25 Der zweite regulatorische Faktor wirkt schließlich auf die Expression des Reportergens ein. Bevorzugt wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch Zusatz ein oder mehrerer inhibitorischer Komponenten die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors gehemmt, dadurch bedingt wird ebenfalls der zweite regulatorische Faktor gehemmt, wobei gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der zweite regulatorische Faktor selbst gehemmt oder in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die Expression des zweiten regulatorischen Faktors gehemmt wird. Da in keinem Fall ein

16

aktiver zweiter regulatorischer Faktor vorliegt, wird das Reportergen bzw. werden die Reportergene exprimiert. Erst die Inhibierung des ersten regulatorischen Faktors bewirkt also eine Expression von Reportergenen. Der jeweilige Phänotyp hängt davon ab, ob der zweite regulatorische Faktor gebildet wird oder nicht. Besonders hervorzuheben werden soll eine weitere Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung, wobei in einem Wirtssystem zwei Genanordnungen für zwei weitere regulatorische Faktoren, insbesondere Genanordnungen für einen Repressor und eine Rekombinase, neben den in z.B. Anspruch 1 erwähnten übrigen zur Versuchsdurchführung notwendigen Genanordnungen, bereitgestellt werden.

15 Je nach Versuchsbedingung wird einer der beiden zweiten regulatorischen Faktoren, d.h. insbesondere Repressor oder Rekombinase, oder werden auch beide gleichzeitig exprimiert. Hierdurch bedingt wird eine erhöhte Spezifität des Verfahrens erreicht.

20 Die Inhibierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors bzw. des Transkriptionsregulators oder dessen Genexpression führt schließlich zur Aktivierung des Reportergens bzw. der Reportergene.

25 Gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist es möglich, hochspezifische Inhibitoren nachzuweisen, sowie Selektivität und Spezifität des Nachweises von Inhibitoren zu erhöhen. Mit dem vorliegenden Verfahren sind so z.B. bei Wachstumsversuchen selektiv die Zellen nachweisbar, auf die der Inhibitor einwirkt hat, während die "nicht gehemmten" Zellen nicht wachsen, d.h. es ergeben sich keine Probleme wie Überwachsen des interessierenden Zellen. Damit wird die Empfindlichkeit des Testsystems entscheidend erhöht und ermöglicht das Screenen von Inhibitorbibliotheken großer Komplexität (über 10^9 verschiedene Moleküle). Somit ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren überhaupt zum ersten Mal

5 möglich, nach Inhibitorzugabe eine Identifikation von Zellen, insbesondere auch aufgrund von Wachstum, durchzuführen. Dies erweist sich als sehr vorteilhaft, wenn z.B. ein sehr ungünstiges Verhältnis von Zellen, auf die der Inhibitor einwirkt (meist sehr geringer Anteil), zu Zellen, auf die der Inhibitor nicht einwirkt, vorliegt. Des weiteren ist es möglich, Aussagen bezüglich des spezifischen Wirkungsortes des Inhibitors zu machen, da gezielt auf z.B. regulatorische Faktoren eingewirkt wird und erst nach Hemmung des Faktors die Reportergene exprimiert werden. So ermöglicht das 10 Verfahren, Signalketten und andere Regulationsmechanismen zu untersuchen und bietet Voraussetzungen für eine spezifische Arzneimittelentwicklung. Das Verfahren dient zur Auffindung von Leitstrukturen, die bevorzugt zur Entwicklung von 15 Therapeutika eingesetzt werden. Des weiteren wird das Verfahren bevorzugt zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die beispielsweise als Leitstrukturen einsetzbar sind, verwendet. Diese inhibierenden Substanzen sind beispielsweise Peptide, Naturstoffe und synthetische 20 Chemikalien. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Inhibierung des ersten regulatorischen Faktors *in vivo* synthetisierte Peptidbibliotheken bereitgestellt.

25 Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt, wobei die Ausführung jeweils unter Berücksichtigung eines aktiven bzw. inaktiven ersten regulatorischen Faktors erläutert wird. Ausgegangen wird bei den Ausführungen von 30 Proteinen als regulatorische Faktoren.

35 Als Reportergen dienen z.B. das *leu2*-Gen, welches Wachstum auf Leucin-defizientem Medium ermöglicht, und das *lacZ*-Gen, dessen Genprodukt, die β -Galactosidase, verschiedene Substrate in einer sichtbaren Farbreaktion umsetzt (X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) ergibt Blaufärbung, ONPG (o-Nitro-phenyl-galactopyranosid) ergibt

5 Gelbfärbung). Entsprechend analog zu *leu2* können auch andere Gene, welche Enzyme aus der Biosynthese codieren, wie z.B. das Gen *URA3*, eingesetzt werden, da seine Expression entsprechend defiziente Hefestämme komplementieren und damit Wachstum auf Uracil defizienten Medien ermöglichen kann 10 (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986)). Auch die Aktivität von Luciferase oder Chloramphenicol-Acetyltransferase kann leicht und schnell in enzymatischen Reaktionen nachgewiesen werden (Ibelgauts, Gentechnologie von A bis Z (1990) VCH-Verlag (Weinheim)).

15 Die Erfindung wird nachfolgend anhand der beiliegenden Zeichnungen näher erläutert.

20 Fig. 1a und 1b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reportergene, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 1a) und eines inaktiven (Fig. 1b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

25 Fig. 2a und 2b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reportergene, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 2a) und eines inaktiven (Fig. 2b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

30 Fig. 3a und 3b zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reportergene, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 3a) und eines inaktiven (Fig. 3b) Transkriptionsfaktors mit der DNA dargestellt ist.

19

Fig. 4a und 4b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 4a) und eines inaktiven (Fig. 4b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

Fig. 5a und 5b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 5a) und eines inaktiven (Fig. 5b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

15 Fig. 6a und 6b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 6a) und eines inaktiven (Fig. 6b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

20 Fig. 7a und 7b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor sowie für die Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 7a) und eines inaktiven (Fig. 7b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

30 Fig. 8a und 8b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für eine Rekombinase sowie für Reporterproteine, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 8a) und eines inaktiven (Fig. 8b) Transkriptionsregulators mit der DNA dargestellt ist.

35

20

Fig. 9a und 9b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen Repressor LexA-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 9a) und eines inaktiven (Fig. 9b) ersten regulatorischen Faktors AD1-Tet mit der DNA dargestellt wird.

Fig. 10a und 10b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 10a) und eines inaktiven (Fig. 10b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2 mit der DNA dargestellt wird.

15 Fig. 11a und 11b

zeigen schematisch dargestellte Genanordnungen für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST, wobei die Wechselwirkung eines aktiven (Fig. 11a) und eines inaktiven (Fig. 11b) ersten regulatorischen Faktors LexA-CTF2 - AD1-TIM mit der DNA dargestellt ist.

Bei den in den Fig. 1 und 3 genannten Targets (Zielen) bzw. transkriptionsstimulierenden Targets handelt es sich um regulatorische Faktoren, insbesondere um

Transkriptionsfaktoren für die Expression der zweiten regulatorischen Faktoren, auf die der Inhibitor einwirkt. Die regulatorischen Faktoren sind in den in den Figuren gezeigten Beispielen ein Repressor bzw. eine Rekombinase.

Bei den in den Fig. 2 und 4 genannten Targets (Zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden regulatorischen Komponenten des regulatorischen Faktors, wobei Target 1 die regulatorische Komponente mit der

35

bindenden Aktivität und Target II die regulatorische Komponente mit der transkriptionsaktivierenden Aktivität ist.

Bei den in den Fig. 5 und 6 genannten Targets (Zielen) handelt es sich um die miteinander interagierenden Komponenten des ersten regulatorischen Faktors, wobei Target I die regulatorische Komponente mit sowohl der DNA bindenden als auch der transkriptionsaktivierenden Aktivität und Target II die Komponente ist, mit der Target I wechselwirkt und ausschließlich bei ungestörter Wechselwirkung in der aktiven Form vorliegt.

Bei den in den Fig. 7 und 8 genannten Targets (Zielen) handelt es sich um miteinander interagierende Komponenten, wobei Target II die regulatorische Komponente mit sowohl einer inhibierenden Aktivität als auch einer bindenden Aktivität, und Target III eine verankerte Komponente ist.

Die bindende Aktivität des Target II bezieht sich auf die Wechselwirkung des von Target III gelösten Targets II mit der X-Komponente von Target I. Die X-Komponente von Target I wiederum ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor des zweiten regulatorischen Faktors.

Mit der Bezeichnung Aktivität werden insbesondere Proteinabschnitte bezeichnet, die die jeweilige Aktivität bzw. die betreffende Funktion bewirken. Hierbei können eine oder mehrere Domänen betroffen sein. Die Domänen bzw. Proteinabschnitte können in verschiedenen Bereichen eines Proteins oder auf verschiedenen Proteinen lokalisiert sein.

Entsprechend sind die Bindestellen dieser Faktoren als Target-Bindestellen bezeichnet.

In den Beispielen 1 bis 11 wurde wie folgt vorgegangen:

Hefe-Plasmide

Zur Expression der verschiedenen Gene in dem zugrundeliegenden Assay werden sowohl kommerziell erhältliche Plasmide (z.B. pYES2 der Firma Invitrogen, Niederlande), als auch andere Konstrukte (Altman, H. Dissertation (1994), Altman H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1994) 91, S. 3901-3905) eingesetzt. Normalerweise besitzen diese Plasmide einen Replikationsursprungsort zur Vermehrung ihrer DNA in Hefen (z.B. "2µm-ori") sowie einen zur Replikation in Bakterien (z.B. "ColEI-ori"). Desweiteren werden Marker gene zur Selektion dieser Plasmide in den beiden Organismen verwendet (z.B. URA3, HIS3, TRP1 oder LEU2 in Hefe sowie Amp^r oder Tet^r in E. coli) (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986); Ibelgaufes, Gentechnologie von A bis Z (1990) VCH-Verlag (Weinheim)). Beispiele für Hefevektoren sind beschrieben (Winnacker et al., From Genes to Clones (1987) VCH-Verlag (Weinheim); The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (1991) Vol. 1 und 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Die Expression von Genen kann über konstitutive (z.B. ADHI-Promotor), induzierbare (z.B. GalI-Promotor) oder eigens konstruierte Target-abhängige Promotoren (NFI, Tet, LexA) erfolgen.

Anstelle in Plasmide kloniert können die einzelnen Elemente des Assays auch in das Genom des verwendeten Hefestammes integriert werden (Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods, In: Yeast Genetics, (1986)). Derartig in der Hefe lokalisierte Elemente benötigen keinen eigenen Replikationsursprungsort sowie Selektionsmarker.

Folgende Elemente werden im Testsystem verwendet:

23

a) Promotoren:

ADHI-Promoter: Dieser konstitutiv exprimierende Promotor wird über die Restriktion mit den Enzymen BamHI und HindIII funktionell aus dem Plasmid pAH5 isoliert (Ammerer et al., Methods in Enzymology (1983) Academic Press, S. 192-201).

Gall-Promoter: Dieser auf Glukose-haltigen Medien reprimierbare und auf Galaktose-haltigen Medien induzierbare Promotor wird mit Hilfe des Restriktionsenzym SpeI aus dem Vektor pYES2 der Firma Invitrogen (Niederlande) isoliert.

Inaktiver Gall/GallIO-Promoter: Dieser ursprünglich über Galaktose induzierbare Promotor wird auf Sequenzebene derart deletiert, daß er in Hefe nur mehr basale Aktivität besitzt (Yocum et al., Mol. Cell. Biol. (1984) 4, S. 1985-1998; West et al., Mol. Cell. Biol. (1984) 4, S. 2467-2478). Mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI und HindIII wird dieses Promotorelement aus dem so konstruierten Vektor pLR101 isoliert und für weitere Zwecke verwendet.

NFI-abhängiger Promoter: Die von Meistern et al. (Nuc. Acid Res. (1988) 236, S. 27-32) gefundene Konsensussequenz als DNA-Bindungsstelle für Mitglieder der NFI-Familie (Nuklear Faktor 1) wird als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von NFI-abhängigen Promotoren verwendet (Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, S. 3901-3905).

Sequenz für 6 NFI-Bindestellen konstruiert aus zwei Oligonukleotiden:

24

1. Oligo:

5'- TCG ACT TTT TCG CAC TGT GCC AAT TCT TTT TCG CAC TGT GCC AAT TCT
3'- CA AAA ACC GTG ACA CGG TTA AGA AAA ACC GTG ACA CGG TTA ACA
TTT TCG CAC TGT GCC AAT TC - 3'
AAA ACC GTG ACA CGG TTA AG - 5'

2. Oligo:

5'- TTT TTG GCA CTG TCG CAA TTC TTT TTG GCA CTG TCG CAA TTC TTT TTG
3'- AAA AAC CGT GAC ACG GTT AAG AAA AAC CGT GAC ACG GTT AAG AAA AAC
GCA CTG TCG CAA TTC - 3'
CGT GAC ACG GTT AAG ACG T - 5'

Tet-abhängiger Promoter: Die von Hillen et al. (Nature (1982) 297, S. 700-702) gefundene Konsensussequenz als DNA-Bindungsstelle für den Tet-Repressor wird als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von Tet-abhängigen Promotoren verwendet.

Sequenz für die Tet-Operator-Bindestelle O₁/O₂:

5'- TCG ATC TCT ATC ACT GAT ACG GAC TGG TAA AAT AAT TCT ATC AAT GAT
3'- AG AGA TAG TGA CTA TCC CTC ACC ATT TTA TTG AGA TAG TTA CTA
ACA - 3'
TCT CAG A - 5'

LexA-abhängiger Promoter: Die DNA-Konsensussequenz als Bindungsstelle für den bakteriellen Repressor LexA wurde als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von LexA-abhängigen Promotoren verwendet (Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, S. 3901-3905; Wendler et al., Nuc. Acid Res. (1994) 22, S. 2601-2603; Brent et al., Cell (1985) 43, S. 729-736). Um die reprimierende Aktivität von LexA-Fusionen auf den Galaktose-induzierten Gall-Promotor nachzuweisen, wird mit Hilfe des Restriktionsenzym BamHI dieser Promotor aus dem Plasmid JK101 (Golemis et al., Mol. Cell. Biol.

25

(1992) 12, S. 3006-3014) isoliert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

loxP-abhängiger Promotor: Die von Hoess et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, S. 3398-3402) beschriebenen loxP-Elemente, welche an der Rekombinase Cre des Coliphagen P1 erzwungenen Zwischen zwei derartigen Elementen liegende Sequenzen zu deletieren oder zu invertieren werden als Oligonukleotid synthetisiert und für die Konstruktion von Cre-abhängigen Promotoren verwendet.

Sequenz für das loxP-Rekombinase Element:

5' - GAG ATC ATA TTC AAT AAC CCT TAA TAT TAC TTC GTA TAA TGT ATG CTA
3' - CTC TAG TAT AAG TTA TTG GGA ATT ATA TTG AAG CAT ATT ACA TAC GAT
TAC GAA GTT ATT AAG TCG - 3'
ATC CTT CAA TAA TCC AGC AGC T - 5'

20 b) Reportergene.

LacZ-Gen: Das LacZ-Gen wird über die Restriktionsenzyme BamHI und HindIII aus dem Plasmid pMC1871 (Casadaban et al., J. Meth. in Enzy. 100, (1983) 100, S. 293-308) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

Lou2-Gen: Das Lou2-Gen wird mittels PCR-Reaktion aus dem Plasmid pAAH5 (Ammerer, Methode in Enzymology (1983), S. 192-201, Academic Press) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

eingesetzte Sequenzprimer:

Lou1: 5' - CGC GGA TCC ATG TCT GCC CTT AAG - 3'
Lou1rev: 5' - GCT CTA GAT CTT TTT AAG CAA GGA TTT TC - 3'

26

Tet-Gen: Das Tet-Gen wird mittels der Restriktionsenzyme XbaI und BstEII aus dem Plasmid pBH1950, ein Derivat des Plasmides pRT240 (Wissmann et al., Genetics (1991) 128, S. 225-232) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

Cre1-Gen: Das Cre1-Gen wird mittels PCR-Reaktion aus dem Coliphagen P1 (Hoess et al., J. Mol. Biol. (1985) 181, S. 351-363) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

eingesetzte Sequenzprimer:

Cre1: 5' - GCG GTA CCT ATG TCC AAT TTA CTG AC - 3'
Cre1rev: 5' - GCG GTA CCG CGG CCG CCT AAT CCG CAT CTT CC - 3'

c) Targetgene

NFI-Gen: Die verschiedenen NFI-Gene werden kloniert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt (Meisterernst et al., Nuc. Acid Res. (1988) 236, S. 27-32; Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

LexA-Gen: Das LexA-Gen wird mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI aus dem Plasmid pEG202, einem Derivat des Vektors LexA202 mit einer zusätzlichen Polylinkersequenz hinter dem LexA-Gen (Ruden et al., Nature (1991) 350, S. 250-252) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

NFKB-Gen: Die codierende Sequenz für die transkriptionsaktive Domäne TPA (Aminosäure 521-551) des Proteins NFKB wird mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoRI aus dem Plasmid pLexTA1 (Schmitz et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, S. 25613-25620) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

5 **TIM-Gen:** Die codierende Sequenz für den C-terminalen Teil des TIM-Proteins wird mit CTF2, einem Mitglied der NPY-Familie, im sog. "interaction trap" (Current Protocols in Molecular Biology, 1994; Altman (1994) Dissertation) isoliert.

10 **GST-Gen:** Die kodierende DNA-Sequenz für die 26 kDa-Domäne aus dem GST Protein (Glutathion-S-Transferase) wird mittels Restriktionsenzymen aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pGEX 3X der Firma Pharmacia (Schweden) isoliert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

15 **ADL-Tet:** Das Fusionsgen ADL-Tet setzt sich aus der sauren Aktivierungsdomäne ADL, isoliert aus dem Plasmid pJG4-5 (Gyuris et al., Cell (1983) 75, S. 791-803) mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI, und der kodierenden Sequenz für den Tet-Repressor (siehe oben) zusammen.

20 d) **Inhibitorexpression:**

25 **TrxA-Gen:** Das TrxA-Gen wird mittels PCR-Reaktion aus dem Plasmid pCJF7 (Lim et al., J. Bact. (1985) 163, S. 31-36) isoliert und für die weiteren Klonierungen eingesetzt.

eingesetzte Sequenzprimer:

30 **TrxA:** 5'- GGA ATT CCC CGG GAT GAG CCA TAA AAT TC - 3'
TrxArev: 5'- CGG GAT CCC TCG ACT CAG CTA ATT ACC CGG GTA CCA CTT G - 3'

"Random Oligo-Pool": Zur Konstruktion eines "Random Oligo-Pools" wird ein Einzelstrangoligonukleotid-Pool folgender Zusammensetzung synthetisiert:

Sequenz:

5'- TAG CCG ATT TAG GTG ACA CTA TAG ACA GCT CTT CCG TCT GGC TAG CAG
BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN BNN
TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA...-3'

10 N bedeutet, daß an dieser Stelle alle 4 möglichen Basen (A, G, C und T) bei der Synthese zugegeben wurden (IUPAC-Nomenklatur).

B bedeutet, daß an dieser Stelle die drei Basen G, C und T bei der Synthese zugegeben wurden (IUPAC-Nomenklatur).

15 Mittels Klenow-Polymerase werden aus den Einzelsträngen Doppelstränge hergestellt.

20 Diese wurden anschließend nach Inkubation mit dem Restriktionsenzym SmaI in die Restriktionsstelle des TrxA-Genes kloniert.

Experimentelle Vorgehensweise

25 Die Kultivierung und Transformation von Bakterien, Hefen und höheren eukaryontischen Zellen erfolgt nach Standardbedingungen (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987), John Wiley & Sons (New York); Miller, Experiments in Molecular Genetics (1972), Cold Spring Harbour, N.Y.; Sambrook et al., Molecular Cloning (1989), Cold Spring Harbour Laboratory Press; Lindl et al., (1987); Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

30 Die Bakterienstämme JK101 der Firma Stratagene (Deutschland) und Top10 der Firma Invitrogen (Deutschland), sowie die Hefestämme INVSc1 und INVSc2 der Firma ITC (Deutschland) wurden für die Experimente eingesetzt.

Die Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität, dem LacZ-Genprodukt, erfolgt in sogenannten β -Galaktosidase Assays (Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, S. 3901-3905).

Zur Bestimmung der CAT-Enzym Aktivität in Proteinextrakten nach dem Immunsaysprinzip wird beispielsweise der von der Firma Boehringer (Deutschland) kommerziell erhältliche "CAT-ELISA"-Test verwendet.

Beispiel 1

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 1 angegebene Konfiguration dar.

1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für einen Transkriptionsfaktor codiert. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an DNA-Bereiche einer DNA (Target-Bindestelle), die für einen zweiten regulatorischen Faktor, in dieser Versuchsanordnung für einen Repressor, codiert.

2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer Bindestelle auf der DNA (Target-Bindestelle) für den unter 1 genannten Transkriptionsfaktor bereitgestellt.

3. Eine Reporteranordnung mit den Reportergen *luc2* und/oder *lacZ* wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer Transkriptionsfaktor TF) bindet, aus einer oder

mehreren Repressorerkennungssequenzen, an die ein Repressor binden kann, und einer TATA-Box für die basale Transkription zusammen.

a. Wird der Versuchsanordnung kein Inhibitor zugesetzt, liegt ein aktiver Transkriptionsfaktor vor, der die Expression eines Repressorproteins positiv reguliert. Der aktive Repressor bindet an die oben genannte Repressorerkennungssequenz bzw. Repressorbindestelle und reprimiert die Expression des Reportergens *lacZ* und/oder *luc2*, d.h. es findet kein Wachstum der Wirtsorganismen statt, eine Farbreaktion ist nicht nachzuweisen.

b. Nach Zugabe eines Inhibitors wird die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors, hier Transkriptionsfaktor, gehemmt. Dies ist auf eine Hemmung der Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen. Es findet keine Expression des Repressorgens statt. Somit steht kein Repressor zur Verfügung, und das dem Promotor nachgeschaltete Reportergen *lacZ* und/oder *luc2* wird durch einen induzierbaren endogenen Transkriptionsfaktor stark exprimiert. Infolgedessen wachsen die Hefen in Leucin-defizienten Medien, und nach Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.

Die Zugabe eines Inhibitors führt also gemäß der vorliegenden Erfindung zu einer Expression des Reportergens/der Reportergene, indem der zweite regulatorische Faktor, hier Repressor, gehemmt wird.

31

Beispiel 2

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 2 dargestellte Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechsellwirkende Hybridproteine des Transkriptionsregulators codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein Hybridprotein codiert, welches ein Fusionsprotein aus einer Binde-domäne und einer ersten Proteinkomponente ist, sowie eine weitere Anordnung für ein Hybridprotein codiert, welches ein Fusionsprotein aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist (Fig. 2a).

2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsregulator bereitgestellt.

3. Eine Reporteranordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

a. Der Transkriptionsregulator setzt sich, wie oben beschrieben, aus zwei Fusionsproteinen zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt (siehe Fig. 2a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsregulator ist vorhanden. Dieser aktive Transkriptionsregulator bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (Target-Bindestelle), welche für das Repressorgen codiert, und bewirkt eine Expression

32

des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im Promotorbereich der Reportergene und reprimierte eine Expression der Reportergene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionsproteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsregulator oder ein in seiner Aktivität vermindelter Transkriptionsregulator vor, da die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und die DNA-Binde-domäne auf verschiedenen Fusionsproteinen lokalisiert sind und demzufolge bei einer Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine diese Domänen nicht oder vermindert miteinander wechselwirken können.

Die DNA-Binde-domäne des einen Fusionsproteins des Transkriptionsregulators kann, je nach Versuchsbedingung und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt binden oder nicht binden. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsregulators findet keine Expression des Repressorgens statt.

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors, die Reportergene *leu2* und/oder *lacZ* exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Weitere bevorzugte Ausführungen ergeben sich aus Abwandlungen der unter den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Ausführungsformen.

Beispiel 3

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 3 gezeigte Konfiguration.

1. Eine Genanordnung, welche für einen Transkriptionsfaktor codiert, wird bereitgestellt. Dieser Transkriptionsfaktor bindet an Bereiche einer DNA (Target-Bindestelle), die für eine Rekombinase codiert.

2. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase des Coliphagen P1 codiert.

3. Eine Reportergenordnung mit den Reportergen *leu2* und/oder *lacZ* wird bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein

endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

a. Wie bereits unter Beispiel 1 beschrieben, liegt, sofern kein Inhibitor zugesetzt wird, ein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression der Rekombinase Cre positiv. Die Rekombinase interagiert mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene *lacZ/leu2* flankieren und eliminiert oder invertiert in einem Rekombinationsprozeß die genannten Reportergene.

Entsprechend werden keine funktionellen Reportergene exprimiert, es findet kein Wachstum der Wirtsorganismen statt, und es ist auch keine Farbreaktion nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium nachweisbar.

b. Nach Zugabe eines Inhibitors wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors gehemmt, wobei dies auf eine Hemmung der Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der entsprechenden Bindestelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen ist. Demzufolge findet keine Expression der Rekombinase statt und die dem Promotor nachgeschalteten Reportergene *lacZ* und/oder *leu2* werden durch einen induzierbaren, bevorzugt endogenen Transkriptionsfaktor stark exprimiert. Die Wirtsorganismen, in dieser Versuchsanordnung sind es bevorzugt Hefen, wachsen nun auf Leucin-defizienten Medien und bel Wachstum in X-Gal-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.

35

Die Zugabe eines Inhibitors führt also wiederum zu einer Expression von Reportergenen.

Beispiel 4

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 4 dargestellte Konfiguration.

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 2 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Hybridproteine codieren, welche über eine Protein-Protein-Wechselwirkung einen aktiven Transkriptionsregulator bilden.

2. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen P1 codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.

3. Eine Reportergenordnung mit den Reportergenen *leu2* und/oder *lacZ* wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält *UAS*-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine *TATA*-Box. Die Reportergene weisen flankierende *lox P*-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

4. Wie auch unter Beispiel 2 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den den Transkriptionsfaktor bildenden Fusionsproteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsfaktor vorliegt. Der aktive Transkriptionsfaktor bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase

36

codierende *cre*-Gen enthält. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder invertiert über Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene, wobei sie mit den *lox P*-Sequenzen, welche die Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach einer Elimination als auch nach einer Inversion werden keine funktionellen Reportergene exprimiert. Demzufolge findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum auf *leucin*-defizientem Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.

b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsaussatz wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionsproteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsregulator vor. Die DNA-bindende Domäne des einen Fusionsproteins des Transkriptionsregulators bindet, je nach Versuchsbedingungen und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsregulators bindet kein Transkriptionsregulator an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert. Entsprechend werden die Reportergene *leu2* und/oder *lacZ* weder eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in *leucin*-defizientem Medium ermöglicht

Wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem Medium auftritt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase, gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene erst ermöglicht wird. Die Nutzung einer Rekombinase in dem vorliegenden Verfahren ermöglicht einen Inhibitornachweis nach einem "Alles-oder-Nichts"-Prinzip, wobei sich, gemäß der vorliegenden Erfindung, der positive Nachweis von Reportergenen nach Inhibitorzugabe als besonders geeignet erweist und sehr empfindliche Nachweise ermöglicht.

Beispiel 5

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 5 angegebene Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Proteine codieren, wobei eine Anordnung für ein Protein codiert, welches eine DNA-bindende Domäne, eine Domäne, welche an ein weiteres zweites Protein bindet, und eine aktivierende Domäne enthält, sowie eine weitere Anordnung für ein weiteres zweites Protein, welches mindestens eine mit dem ersten Protein wechselwirkende Domäne enthält (Fig. 5a).
2. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsregulator bereitgestellt.

3. Eine Reportergenanordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

a. Der Transkriptionsregulator setzt sich aus den beiden oben beschriebenen Proteinen zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt (siehe Fig. 5a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung (Target I - Target II) statt und ein aktiver Transkriptionsregulator liegt vor. Der aktive Transkriptionsregulator bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (Target I-Bindestelle), welche für das Repressorgen codiert, und bewirkt eine Expression des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da *Leu2* und/oder *LacZ* nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf *Leucin-defizientem* Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsregulator vor, da bei einer Hemmung der Wechselwirkung der Proteine der Transkriptionsregulator nicht in der aktiven Form (Konformation) vorliegt.

Die DNA-bindende Domäne des einen Proteins des Transkriptionsregulators kann, je nach Versuchsbedingung und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt binden oder nicht binden. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsregulators findet keine Expression des Repressorgens statt.

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors TF, die Reportergene *Leu2* und/oder *lacZ* exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Beispiel 6

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 6 dargestellte Konfiguration.

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 5 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Proteine codieren, welche über eine Protein-Protein-Wechselwirkung einen aktiven Transkriptionsregulator bilden.

2. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des

Collipagen P1 codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.

3. Eine Reportergenordnung mit den Reportergenen *Leu2* und/oder *lacZ* wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

a. Wie auch unter Beispiel 5 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den den Transkriptionsregulator bildenden Proteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsregulator vorliegt. Der aktive Transkriptionsregulator bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase codierende Cre-Gen enthält. Nach Bindung des Transkriptionsregulator wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Rekombinase eliminiert oder invertiert über Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene, wobei sie mit den lox P-Sequenzen, welche die Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach einer Elimination als auch nach einer Inversion werden keine funktionellen Reportergene exprimiert. Demzufolge findet ohne Zugabe eines Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.

b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsansatz wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der

Proteine, z.B. über Konfirmationsänderung, des Transkriptionsregulators gehemmt. Es liegt somit kein aktiver Transkriptionsregulator vor. Die DNA-bindende Domäne des einen Proteins des Transkriptionsregulators bindet, je nach Versuchsbedingungen und zugesetztem Inhibitor, an den betreffenden DNA-Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Infolge des fehlenden aktiven Transkriptionsregulators bindet kein Transkriptionsregulator an die Bindestelle auf der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert. Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert. Entsprechend werden die Reportergene *leo2* und/oder *lacZ* weder eliminiert noch invertiert. Eine fehlende Rekombinase führt somit zu einer Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der Zellen in *leucin*-defizientem Medium ermöglicht wird bzw. eine Blaufärbung in *X-Gal*-haltigem Medium auftritt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem *lox-Cre*-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines Inhibitors die Expression des zweiten regulatorischen Faktors, der *Cre-Rekombinase*, gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene erst ermöglicht wird. Die sich ergebenden Vorteile wurden bereits in Beispiel 4b beschrieben.

Beispiel 7

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 7 dargestellte Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Proteine Target II und Target III codieren sowie eine *UNS*-Sequenz und eine *TATA*-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein Protein Target III codiert, welches ein Protein aus einem verankerten Abschnitt und einer ersten Proteinkomponente ist, und eine weitere Anordnung für ein Protein Target II codiert, welches ein Fusionsprotein aus einem inhibierenden Abschnitt und einer zweiten Proteinkomponente ist (Fig. 7a).

2. Es wird eine Genanordnung für einen Transkriptionsfaktor Target I bereitgestellt, der inhibiert werden kann.

3. Des weiteren wird eine Repressorgenanordnung mit einer oder mehreren Bindestellen auf der DNA (Target-Bindestelle) für den Transkriptionsfaktor bereitgestellt.

4. Eine Reportergenanordnung, wie unter Beispiel 1, Punkt 3, beschrieben, wird ebenfalls bereitgestellt.

a. Bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Proteine kann der inhibierende Abschnitt des ersten Proteins nicht mit dem Transkriptionsfaktor wechselwirken, somit liegt ein aktiver Transkriptionsfaktor vor (siehe Fig. 7a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsfaktor ist vorhanden. Dieser aktive Transkriptionsfaktor bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA, welche für das Repressorgen codiert. Der bewirkt eine Expression des Repressorgens. Der Repressor bindet an die Repressorbindestelle im

Promotorbereich der Reportergene und reprimiert eine Expression der Reportergene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium statt, noch findet eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. die vorstehend erwähnten Inhibitoren, beispielsweise Peptide, Nucleinsäuren, Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Proteine Target II und Target III gehemmt. Das Protein mit dem inhibierenden Abschnitt Target II wird freigesetzt und bindet an den Transkriptionsfaktor Target I, wodurch dieser inhibiert wird. Es liegt nun kein aktiver Transkriptionsfaktor vor.

Aufgrund der gehemmten Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem Fall ein aktiver Transkriptionsregulator vor. Aufgrund des inaktiven Transkriptionsfaktors findet keine Expression des Repressorgens statt.

Da kein Repressor vorliegt, werden, nach Bindung eines entsprechenden weiteren Transkriptionsfaktors TP, die Reportergene Leu2 und/oder LacZ exprimiert. Es findet nun Wachstum der Wirtszellen auf Leucin-defizientem Medium statt bzw. ein Farbumschlag (Blaufärbung) nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium ist nachweisbar. Gemäß der vorliegenden Erfindung führt die Zugabe eines Inhibitors über Hemmung des zweiten regulatorischen Faktors (Repressor) zu einer Expression der Reportergene.

Beispiel 8

Dieses Beispiel bezieht sich auf die in Fig. 8 dargestellte Konfiguration.

1. Es werden Genanordnungen, wie unter Beispiel 7 beschrieben, bereitgestellt, die für wechselwirkende Proteine codieren.

2. Es wird eine Genanordnung für einen Transkriptionsfaktor bereitgestellt (Target I).

3. Des weiteren wird eine Genanordnung bereitgestellt, welche für die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen $\phi 1$ codiert. Diese Rekombinase entspricht dem zweiten regulatorischen Faktor.

4. Eine Reportergenordnung mit den Reportergenen Leu2 und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor enthält UAS-Elemente, an die bevorzugt ein endogener Aktivator bindet, und eine TATA-Box. Die Reportergene weisen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente auf.

a. Wie auch unter Beispiel 7 beschrieben, findet, sofern kein Inhibitor vorliegt, eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den Proteinen statt, womit ein aktiver Transkriptionsfaktor vorliegt. Der aktive Transkriptionsfaktor Target I bindet an eine auf der DNA befindlichen Bindestelle, wobei diese DNA das für die Cre-Rekombinase codierende Cre-Gen enthält. Nach Bindung des Transkriptionsfaktors

10 wird die Cre-Rekombinase exprimiert. Diese
Rekombinase eliminiert oder invertiert über
Rekombinationsprozesse das oder die Reportergene,
wobei sie mit den lox P-Sequenzen, welche die
5 Reportergene flankieren, interagiert. Sowohl nach
einer Elimination als auch nach einer Inversion
werden keine funktionellen Reportergene
exprimiert. Demzufolge findet ohne Zugabe eines
Inhibitors kein Wachstum auf Leucin-defizientem
Medium statt, ebenso keine Blaufärbung bei
Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium.

15 b. Nach Zugabe eines Inhibitors zu dem Versuchsaansatz
wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der
Proteine Target II und Target III gehemmt. Das
Protein mit dem inhibierenden Abschnitt Target II
wird freigesetzt und interagiert mit dem
Transkriptionsfaktor, wodurch dieser inhibiert
20 wird. Es liegt somit kein aktiver
Transkriptionsfaktor vor. Die DNA-bindende Domäne
des Transkriptionsfaktors bindet, je nach
Versuchsbedingungen, an den betreffenden DNA-
Abschnitt oder nicht. Aufgrund der gehemmten
Protein-Protein-Wechselwirkung liegt in keinem
Fall ein aktiver Transkriptionsfaktor vor. Infolge
des fehlenden aktiven Transkriptionsfaktors bindet
kein Transkriptionsfaktor an die Bindestelle auf
der DNA, welche für die Cre-Rekombinase codiert.
Die Cre-Rekombinase wird somit nicht exprimiert.
Entsprechend werden die Reportergene leu2 und/oder
lacZ weder eliminiert noch invertiert. Eine
fehlende Rekombinase führt somit zu einer
Expression der Reportergene, wodurch Wachstum der
Zellen in Leucin-defizientem Medium ermöglicht
35 wird bzw. eine Blaufärbung in X-Gal-haltigem
Medium auftritt.

5 Gemäß der vorliegenden Erfindung wird in dem lox-
cre-abhängigen Verfahren nach Zugabe eines
Inhibitors die Expression des zweiten
regulatorischen Faktors, der Cre-Rekombinase,
gehemmt, wodurch eine Expression der Reportergene
erst ermöglicht wird.

Beispiel 2

10 Die Funktionsweise des Verfahrens wird am Beispiel des
Tet-Repressors und dessen spezifische Inhibierung durch
Tetracyclin näher erläutert.

15 Dieses Beispiel stellt die in Fig. 9 angegebene
Konfiguration dar.

20 1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für den
ersten regulatorischen Faktor AD1-Tet codiert. Dieser
regulatorische Faktor bindet an DNA-Bereiche einer
DNA (Tet-Bindestelle), die für den zweiten
regulatorischen Faktor, den Repressor LexA-GST,
codiert.

25 2. Des weiteren wird eine Repressororganisation des
Repressors LexA-GST mit einer Bindestelle auf der DNA
(Tet-Bindestelle) für den unter 1 genannten ersten
regulatorischen Faktor AD1-Tet bereitgestellt.

30 3. Eine Reporterorganisation mit den Reportergen leu2
und/oder lacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei
beide Reportergene im vorliegenden Verfahren vom
Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor
besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten
UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die
bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer

Transkriptionsfaktor Gal4 bindet, aus einer oder mehreren LexA Bindungsstellen, an die ein LexA-GST binden kann, und einer TATA-Box für die Initiation der basalen Transkription zusammen.

a. Durch die Expression des Fusionsklones AD1-Tet (erster regulatorischer Faktor) wird die Expression des Repressors LexA-GST (zweiter regulatorischer Faktor) stimuliert. Dieses Repressorprotein wiederum reprimiert durch die Bindung an die LexA-Bindestelle des in Figur 9 beschriebenen Lac2- bzw. LEU2-Promotors die vom ersten regulatorischen Faktor unabhängige Gal4-aktivierte Expression der Reportergene Lac2 und Leu2. Da die Gal4-aktivierte Expression der Reportergene durch Glukose inhibiert und erst auf Galaktose stimuliert wird, können diese Hefen auf Leucin-defizienten Medien nicht wachsen und bleiben auf X-Gal-haltigem Medium weiß (Tabelle 1). Besitzt das Medium Galaktose als Zuckerquelle, bleibt der Gal1-LexA-Promotor durch die AD1-Tet abhängige Expression des LexA-GST Repressors weiter inhibiert; die Hefekolonien bleiben weiß und wachsen auf Leucin-defizienten Medien nicht.

b. In Abhängigkeit steigender Tetracyklinkonzentration (Figur 9 sowie Tabelle 1 und 2) wird die Bindung des AD1-Tet-Proteins an den Tet-abhängigen Promotor des LexA-GST Repressors spezifisch inhibiert. Die hier verwendete, steigende Tetracyklinkonzentration inhibiert das generelle Wachstum der Hefen nicht. Der zweite regulatorische Faktor ist nun nicht mehr in der Lage, die Aktivität des Reportersystems zu inhibieren. Die Hefezellen werden nun mit Galaktose als Zuckerquelle und X-

Gal als Substrat für das Reportersystem blau und können auf Leucin-defizienten Medien wachsen. Glukose-haltiges Medium dagegen inhibiert die Aktivität des endogenen Transkriptionsfaktors Gal4. Die Hefen wachsen nicht auf Leucin-defizienten Medien und bleiben auf X-Gal-haltigen Medienplatten weiß. Andere Antibiotika wie Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin und Carbenicillin haben keine derartig repräsentierende Wirkung auf den ersten regulatorischen Faktor AD1-Tet (Tabelle 1). Auf Glukose-haltigen Platten wird Gal4 unabhängig vom ersten und zweiten regulatorischen Faktor inhibiert, weswegen auf derartigen Medien die Hefen nicht wachsen und weiß bleiben.

Tabelle 1:

Tetracyclin- zugabe	Wachstum auf LEU-		Blaufärbung auf X-Gal	
	Glukose	Galaktose	Glukose	Galaktose
--	--	--	weiß	weiß
++	--	++	weiß	blau

Tabelle 2: (nur die Ergebnisse der Galaktose-haltigen Platten dargestellt)

a)		Eingestetzte Konzentrationen [µg/ml]				
		0	5	50	250	
Verwendetes Antibiotikum						
Tetracyclin	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	++/blau	
Ampicillin	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	
Kanamycin	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	
Carbenicillin	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	
Chloramphenicol	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	

b)		Eingestetzte Konzentrationen [µg/ml]						
Verwendetes Antibiotikum		0	5	50	100	150	200	250
Tetracyclin	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	--/weiß	++/blau	++/blau	++/blau

c)		Wachstum auf LEU- / Blaufärbung auf X-Gal	
		Wachstum auf LEU- / Blaufärbung auf X-Gal	

5

10 c) Nachweis der Funktionsweise der einzelnen Elemente im Assay

15 - ADI-Tet als Transkriptionsfaktor:

20 Um nachzuweisen, daß der Fusionsklon ADI-Tet (erster regulatorischer Faktor) in der Hefe funktionell exprimiert, in den Kern transportiert und dort effizient an die DNA-Konsensussequenz gebunden wird und von dort aus die Transkription eines Gens aktivieren kann, wurde der folgende Assay durchgeführt:

5 Auf Galaktose-haltigen Medienplatten wird ADI-Tet exprimiert und ist damit in der Lage, an die Tet-Bindestelle eines entsprechenden Promotors vor dem LacZ-Gen zu binden und von dort die Expression des Reportergen LacZ zu aktivieren. Dieses wiederum kann durch die Umwandlung des im Medium enthaltenen, farblosen Substrats X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff nachgewiesen werden. Da Glukose die Expression des ADI-Tet-Proteins inhibiert, findet auch keine Expression des Reportergen LacZ statt. Die Kolonien bleiben weiß.

15 - Tetracyclin als spezifischer Inhibitor des Transkriptionsfaktors Tet-AD

20 Um nachzuweisen, daß Tetracyclin die Bindungsaktivität des ADI-Tet-Proteins spezifisch zu inhibieren vermag, wurden zusätzlich steigende Konzentrationen des Antibiotikums auf die Medienplatten gegeben:

25

Tabelle 3:

		Eingestetzte Konzentrationen Tetracyclin [µg/ml]							
		0	5	50	100	150	200	250	300
Blaufärbung auf X-Gal		blau	blau	blau	blau	blau	weiß	weiß	weiß
Galaktose-haltige Platten mit Leucin im Medium		++	++	++	++	++	++	++	++
Glukose-haltige Platten mit Leucin im Medium		++	++	++	++	++	++	++	++

Wie die experimentellen Daten zeigen, kann in Abhängigkeit steigender Tetracyclinkonzentration (Tabelle 3) die Bindung des ADI-Tet-Proteins an den

Promotor des Reporter-genes LacZ spezifisch inhibiert werden. Bei einer Konzentration von 200 µg/ml Tetracyclin im Medium bleiben die Hefezellen weiß. Das generelle Wachstum der Hefezellen wird dadurch nicht wesentlich beeinflusst, wie die Ergebnisse auf den Glukose- und Galaktose-haltigen Platten zeigen (das Wachstum wird durch "+" dargestellt).

LexA-GST als Repressor

Um nachzuweisen, daß der zweite regulatorische Faktor (LexA-GST) in der Hefe funktionell exprimiert, in den Kern transportiert und dort effizient an die LexA-Konsensussequenz gebunden wird und von dort aus die Transkription eines Gens inhibieren kann, wurde der folgende Assay durchgeführt.

Im Gegensatz zur Negativkontrolle CTF2 (einem Mitglied der NFI-Familie) bleiben die Hefekulturen auf X-Gal- und Galaktose-haltigem Medium weiß. Dies bedeutet, daß der LexA-GST-Fusionskion zwischen der Gal4-Bindestelle und dem Transkriptionsstart des Reporter-gens bindet und damit die Aktivität des endogenen Hefetranskriptionsfaktors Gal4 inhibiert. CTF2 dagegen ist nicht in der Lage die LexA-Bindestellen zu erkennen und kann so die Aktivität von Gal4 nicht reprimieren. Das Reporter-gene LacZ wird exprimiert und die Kolonien färben sich blau (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905).

Beispiel 10

Identifikation spezifischer Peptid-Inhibitoren von CTF7

Um inhibierende Peptidsequenzen gegen den in Hefe transkriptionsaktiven CTF7, einem Mitglied der NFI-

Familie (Altmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905), zu screenen, wurde der folgende Assay (Fig. 10) durchgeführt.

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 10 angegebene Konfiguration dar.

1. Eine Genanordnung wird bereitgestellt, welche für einen ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7 codiert. Das entsprechende Plasmid pEG-CTF7 enthält die Genanordnung für den ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7. Dieser erste regulatorische Faktor LexA-CTF7 bindet an DNA-Bereiche einer DNA (LexA-Bindestelle), die für einen zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST codiert.

2. Des weiteren wird eine Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor Tet-GST mit einer Bindestelle auf der DNA (LexA-Bindestelle) für den unter 1 genannten ersten regulatorischen Faktor LexA-CTF7 bereitgestellt.

3. Eine Reporter-genanordnung mit den Reporter-genen LacZ und/oder LacZ wird ebenfalls bereitgestellt, wobei beide Reporter-gene im vorliegenden Verfahren vom Aufbau her den gleichen regulierbaren Promotor besitzen. Dieser Promotor setzt sich aus sogenannten UAS-Elementen (Upstream Activation Sequence), an die bevorzugt ein endogener Aktivator (weiterer Transkriptionsfaktor Gal4) bindet, aus einer Tet-Bindestelle, an die Tet-GST binden kann, und einer TATA-Box für die Initiation der basalen Transkription zusammen.

a. Wird der Versuchsanordnung kein Inhibitor zugesetzt, liegt ein aktiver erster

53

regulatorischer Faktor *lexA-Crf7* vor, der die Expression des *Tet-GST* Gens positiv reguliert. *Tet-GST* bindet an die oben genannte *Tet-GST* Bindungsstelle und reprimiert die Expression des Reportergens *LacZ* und/oder *Leu2*, d.h. es findet kein Wachstum der Wirtszellen statt, eine Farbreaktion ist nicht nachzuweisen.

b. Nach Zugabe eines *Trx*-Peptids wird die Aktivität des ersten regulatorischen Faktors *LexA-Crf7* gehemmt. Dies ist auf eine Hemmung der Interaktion von *LexA-Crf7* mit der entsprechenden Bindungsstelle auf der DNA oder auf eine Hemmung der Aktivierungsdomäne zurückzuführen. Es findet keine Expression des *Tet-GST*-Gens statt. Somit steht kein *Tet-GST* zur Verfügung, und das dem Promotor nachgeschaltete Reportergen *LacZ* und/oder *Leu2* wird durch einen induzierbaren endogenen Transkriptionsfaktor *Gal4* stark exprimiert. Infolgedessen wachsen die Hefen in *Leu*-defizienten Medien, und nach Wachstum in *X-Gal*-haltigem Medium tritt ein Farbumschlag (Blau) auf.

Die Zugabe des *Trx*-Peptids führt also gemäß der vorliegenden Erfindung zu einer Expression des Reportergens/der Reportergene, indem der zweite regulatorische Faktor *Tet-GST* nicht bzw. vermindert reprimiert wird.

Im Detail wird der Versuch wie folgt durchgeführt:

Der Hefestamm *INVSc1* wurde mit den in Fig. 10 dargestellten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf einer Glukose-haltigen Minimalmediumpalte (20 x 20 cm; Uracil-,

54

Trypophan- und Histidin-defizient zur Selektion auf die Plasmide) ausgestrichen.

Der Vektor *pEG-Crf7* (entspricht dem ersten regulatorischen Faktor) und wurde nach Altman et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905) hergestellt.

pYES-Leu2/34-TetGST (Plasmid, welches den zweiten regulatorischen Faktor *TetGST* codiert und das Reportersystem beinhaltet).

Als Ausgangsvektor diente das Plasmid *pYES2*. Die *LexA*-Bindungsstellen Oligos wurden in die *XhoI* Schnittstelle des inaktiven *Gal1/Gal10* Promotors ligiert, der gesamte Promotor mit *BamHI* isoliert und zusammen mit dem Fusionsklon *Tet-GST* in den Polylinker des Plasmides *pYES2* kloniert. Der *Gal1*-Promotor war zuvor über die *SpeI*-Schnittstellen deletiert worden. In die mit *Klenow*-Polymerase behandelte *NheI*-Schnittstelle dieses Konstruktes erfolgte die Klonierung des über *BamHI* isolierten, ebenfalls mit *Klenow* behandelten *LacZ*-, bzw. des über PCR erhaltenen *Leu2*-Fragments. In die dabei rekonstruierte *BamHI*-Schnittstelle erfolgte die Ligierung des *Gal1/Tet*-Promotors. Dieser wurde durch die Klonierung von *Tet*-Oligos und die anschließende Ligierung von *Gal4*-Bindungsstellen in die *XhoI*-Schnittstelle des inaktiven *Gal1/10*-Promotors erhalten.

pYES2(TRP1)TRX-Oligo-Pool (Peptid-Pool exprimierendes Konstrukt; Komplexität ca. 10⁵)

Durch die Ligierung des *Trp1*-Gens in den mit *ApaI* und *NheI* linearisierten *pYES2*-Vektor, wurde das

Ura3-Gen zerstört und das Plasmid auf Tryptophandefizienz selektierbar. Anschließend wurde das über PCR isolierte Trx-Gen in den EcoRI, XhoI linearisierten Vektor kloniert. Die Ligation der Pool-Fragmente erfolgte über die NotI-Schnittstelle des Trx-Konstruktes.

Die ca. 30.000 Kolonien wurden vereinigt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten besaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren Leucin-, Uracil-, Tryptophan- und Histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen waren 8 Kolonien (A, B, C, D, E, F, G, H) gewachsen (Tabelle 4). Aus diesen wurden zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit CTF7 und Tet-GST in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt des Leu2 das LacZ-Gen auf dem Reporterplasmid, sodaß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 4). Desweiteren wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (LacZ und Leu2) und einem von CTF7 verschiedenen Transkriptionsfaktor LexA-TA1 in Hefen transformiert. Auf diese Weise können CTF7 spezifisch inhibierende Peptide von unspezifischen Inhibitionen unterschieden werden.

Tabelle 4:

Identifizierte Inhibitoren	Wachstum auf Leucin-defizienten Platten	Blaufärbung auf X-Gal-haltigen Platten		Inhibition von LexA-TA1 auf Galaktose
		Glukose	Galaktose	
A	+	-	+	-
B	+	+	+	n.b.
C	+	+	+	n.b.
D	+	-	+	+
E	+	-	+	-
F	+	-	+	-
G	+	-	+	-
H	+	-	+	+

Die Inhibitoren B und C färbten sich auch auf Glukose-haltigen Platten, also unabhängig von der Galaktose-induzierten TRX-Peptidexpression, blau. Dies bedeutet, daß in den entsprechenden Klonen keine inhibierenden Peptide exprimiert werden, welche die Blaufärbung verursachen. Von den Peptiden A, D, E, F, G und H stellten sich D und H als unspezifisch heraus, da sie auch in der Lage waren die LexA-TA1 Domäne zu inhibieren. Die Inhibitoren A, E, F und G dagegen waren nur in der Lage die Aktivität von CTF7 zu reprimieren (n.b.: nicht bestimmt).

Beispiel 11

Identifikation spezifischer Inhibitoren der Protein-Protein-Wechselwirkung LexA-CTF2/AD1-TTX

Der in Fig. 11 beschriebene Assay wird durchgeführt, um inhibierende Peptidsequenzen gegen die in Hefe aktive Protein-Protein-Interaktion LexA-CTP2 und TIM-AD (Altman (1994) Dissertation) zu screenen. LexA-CTP2 ist ein Fusionskonstrukt aus dem bakteriellen Repressor LexA und CTP2, einem Mitglied der NF1-Familie. Hierzu wird der Hefestamm INVSc1 mit den in Fig. 11 dargestellten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf einer Glukose-haltigen Minimalmediumplatte (20 x 20 cm; Uricil-, Tryptophan- und Histidin-defizient zur Selektion auf die Plasmide) ausgestrichen.

Dieses Beispiel stellt die in Fig. 11 dargestellte Konfiguration dar.

1. Es werden Genanordnungen bereitgestellt, die für zwei wechselwirkende Hybridproteine des Transkriptionsregulators codieren sowie eine UAS-Sequenz und eine TATA-Box enthalten, wobei eine Anordnung für ein LexA-CTP2, einem Fusionskonstrukt aus dem bakteriellen Repressor LexA und CTP2, einem Mitglied der NF1-Familie (Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 3901-3905) codiert, sowie eine weitere Anordnung für ein Hybridprotein TIM-AD (Altman (1994), Dissertation).

PSH-CTP2/TIM (entspricht dem ersten regulatorischen Faktor) ist das entsprechende Plasmid, welches den ersten regulatorischen Faktor LexA-CTP2/AD1-TIM codiert.

2. pYES-Leu2/34-TetGST (Plasmid, welches den zweiten regulatorischen Faktor TetGST codiert und das Reportersystem beinhaltet).

3. pYES2(TRP1)TRX-Oligo-Pool (Peptid-Pool exprimierendes Konstrukt; Komplexität ca. 10⁵).

a. Der erste regulatorische Faktor LexA-CTP2/AD1-TIM setzt sich, wie oben beschrieben, aus zwei Fusionsproteinen LexA-CTP2 und AD1-TIM zusammen, wobei nur bei ungestörter Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine ein aktiver erster regulatorischer Faktor PSH-CTP2/TIM vorliegt (siehe Fig. 11a). Liegt kein Inhibitor vor, findet eine ungestörte Protein-Protein-Wechselwirkung statt und ein aktiver Transkriptionsregulator ist vorhanden. Der aktive Transkriptionsregulator LexA-CTP2/AD1-TIM bindet an seine entsprechende Bindestelle auf der DNA (LexA-Bindestelle), welche für das Tet-GST Gen codiert, und bewirkt eine Expression von Tet-GST. Tet-GST bindet an die entsprechende Bindestelle (Tet-GST Bindestelle) im Promotorbereich der Reportergene und repliziert eine Expression der Reportergene. Da Leu2 und/oder LacZ nicht exprimiert werden, findet weder Wachstum auf Leucin-defizientem Medium noch eine Blaufärbung nach Wachstum auf X-Gal-haltigem Medium statt.

b. Wird der Versuchsanordnung ein Inhibitor zugesetzt, wie z.B. ein Trx-Peptid, wird die Protein-Protein-Wechselwirkung der Fusionsproteine LexA-CTP2 und AD1-TIM gehemmt. Es liegt nun kein aktiver erster regulatorischer Faktor vor.

Aufgrund des inaktiven ersten regulatorischen Faktors LexA-CTP2/AD1-TIM findet keine Expression des Tet-GST Gens (Repressor-Gen) statt. Da kein Repressor Tet-GST vorliegt, werden, nach Bindung

eines weiteren Transkriptionsfaktors Gal4, die Reportergene leu2 und/oder lacZ exprimiert.

Im Detail wird der Versuch, wie folgt, durchgeführt:

Die ca. 35.000 Kolonien wurden eingesammelt, für 5 Stunden in YPG-Medium (Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefen) geschüttelt und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten besaßen Galaktose als Kohlenstoffquelle und waren leucin-, uracil-, tryptophan- und histidin-defizient. Im Zeitraum von 2 bis 5 Tagen sind 6 Kolonien (A, B, C, D, E, F) gewachsen. Aus diesen wurden zur weiteren Spezifizierung die für die inhibierenden Peptide kodierenden Plasmide isoliert und zusammen mit LexA-CFP2, TIM-AD und Tet-GSR in Hefe exprimiert. Diesmal befand sich anstatt dem leu2 das lacZ-Gen auf dem Reporterplasmid, so daß die inhibierende Wirkung der Peptide durch die Ausbildung eines zweiten Phänotyps untersucht werden konnte (Tabelle 5). Des weiteren wurden die Peptide exprimierenden Plasmide mit den beiden Reportersystemen (lacZ und leu2) und dem Transkriptionsfaktor LexA-TA1 in Hefen transformiert. Auf diese Weise konnten die TIM-CFP2 Interaktion spezifisch inhibierende Peptide von Unspezifischen abgetrennt werden.

Tabelle 5:

Identifizierte Inhibitoren	Blaufärbung auf X-Gal-haltigen Platten		Inhibition von LexA-TA1 auf Galaktose
	Wachstum auf Leucin-defizienten Platten	Glukose	Galaktose
A	+	+	+
B	+	-	+
C	+	+	+
D	+	-	+
E	+	-	+
F	+	-	+

Die Inhibitoren A und C führten sich auch auf Glukose-haltigen Platten, also unabhängig von der Galaktose-induzierten TRX-Peptidexpression, blau. Dies bedeutet, daß in den entsprechenden Klonen keine inhibierenden Peptide exprimiert werden, welche die Blaufärbung verursachen. Von den Peptiden B, D, E und F stellten sich D und E als unspezifisch heraus, da sie auch in der Lage waren, die LexA-TA1 Domäne zu inhibieren. Dagegen waren die Inhibitoren B und F nicht in der Lage, AD1-Tet zu reprimieren, sind also Inhibitoren für die CFP2-TIM Protein-Protein Wechselwirkung.

In den dargestellten Versuchen 1 bis 11 ergeben sich bei verschiedenen Inhibitoren qualitative und/oder quantitative Unterschiede bezüglich der inhibitorischen Aktivität, d.h. neben einer vollständigen Hemmung des ersten regulatorischen Faktors sind auch graduelle Abschwächungen der Aktivität des ersten regulatorischen Faktors möglich. Entsprechend sind bei der Expression der Reportergene neben der vollständigen Expression auch graduelle Verstärkungen möglich und nachweisbar.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität mindestens eines ersten regulatorischen Faktors, welche über die Aktivität mindestens eines ReporterSystems nachweisbar ist, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - a. Bereitstellen mindestens eines ReporterSystems mit mindestens einer ersten Genanordnung, welche mindestens ein ReporterGen aufweist,
 - b. Bereitstellen mindestens einer zweiten Genanordnung, die für mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor codiert, und Wechselwirkung des zweiten regulatorischen Faktors mit Komponenten des ReporterSystems, wodurch auf die Aktivität des ReporterSystems eingewirkt wird,
 - c. Einwirkung vorzugsweise auf die Aktivität des zweiten regulatorischen Faktors durch den mindestens einen ersten regulatorischen Faktor, und
 - d. Nachweis der Aktivierung des mindestens einen ReporterSystems durch Zugabe mindestens einer inhibitorischen Komponente über das Zusammenwirken der ersten und zweiten regulatorischen Faktoren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erste regulatorische Faktor mit DNA-Abschnitten der für den zweiten regulatorischen Faktor codierenden zweiten Genanordnung wechselwirkt, wodurch auf die Expression des zweiten regulatorischen Faktors eingewirkt wird.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite regulatorische Faktor an DNA-Abschnitte des ReporterSystems bindet.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine erste regulatorische Faktor ein oder mehrere regulierende Komponenten enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die eine oder mehrere regulierende Komponenten ein oder mehrere regulierende Proteine sind.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das regulierende Protein oder die regulierenden Proteine ein oder mehrere Transkriptionsregulatoren sind.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsregulator oder die Transkriptionsregulatoren ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren sind.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das regulierende Protein oder die regulierenden Proteine den mindestens einen zweiten regulatorischen Faktor modifizieren.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation des mindestens einen zweiten regulatorischen Faktors durch Kinasierung, Dephosphorylierung, Spaltung, Umfaltung oder Konformationsänderung erfolgt.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten, welche gemeinsam den ersten regulatorischen Faktor bilden, und/oder auf die Aktivität des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors eingewirkt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens einem ersten regulatorischen Faktor und einem DNA-Abschnitt der mindestens einen zweiten Genanordnung eingewirkt wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Beeinflussung der genannten Aktivität des ersten regulatorischen Faktors durch inhibitorische Komponenten zu einer Einwirkung auf die Genexpression der zweiten Genanordnung führt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Inhibitor über eine Hemmung der Aktivität des regulierenden Proteins zu einer Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung führt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Zugabe der inhibitorischen Komponente auf die Wechselwirkung zwischen mindestens zwei Komponenten eingewirkt wird, wobei die mindestens eine erste Komponente eine regulatorische Komponente ist oder enthält.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Komponente eine Proteinkomponente ist oder enthält.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente ein Fusionsprotein ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Komponente eine inhibitorische Komponente ist oder enthält.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Komponente mindestens eine Proteinkomponente ist oder enthält.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Proteinkomponente mindestens ein Fusionsprotein ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine zweite Komponente eine Verankerungsfunktion besitzt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten diese Proteinkomponenten im Cytoplasma lokalisiert sind.

22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten diese Proteinkomponenten an oder in einer Membran lokalisiert sind.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Zugabe einer inhibitorischen Komponente über eine Hemmung der Wechselwirkung zwischen den mindestens zwei Komponenten die mindestens eine erste Komponente, welche den inhibitorisch wirksamen Abschnitt enthält, freigesetzt wird und mit dem transkriptionsaktivierenden Faktor der Genanordnung für den zweiten regulatorischen Faktor interagiert.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der transkriptionsaktivierende Faktor durch den freigesetzten inhibitorisch wirkenden Faktor gehemmt wird, wodurch eine Hemmung der Expression der zweiten Genanordnung erfolgt.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsorganismen Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, oder eukaryotische Zellen, vorzugsweise Hefen, eingesetzt werden.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Bakterienstamm *Escherichia coli* oder der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Genprodukt des mindestens einen Reportergens nachweisbar ist.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis des Genproduktes durch eine oder mehrere Veränderungen des Phänotyps des Wirtsorganismus erfolgt.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das mindestens eine Genprodukt des Reportergens Zellwachstum der Wirtsorganismen in Mangelmedium ermöglicht.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt des Reportergens *leu2* ist und Zellwachstum in *leucin*-defizientem Medium ermöglicht.

31. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt des Reportergens *lacZ* Substrate in einer meßbaren Farbreaktion umsetzen kann.

32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Genanordnungen auf verschiedenen Vektoren angeordnet sind.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß die genannten Genanordnungen auf demselben Vektor angeordnet sind.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektoren Plasmide sind.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Vektoren mit einer oder mehreren Genanordnungen ins Wirtsgenom integriert sind.

36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Genanordnung für mindestens einen Repressor codiert.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Repressor auf die Expression des mindestens einen Reportergens einwirkt.

5 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, daß der Repressor durch Bindung an Komponenten des Reportersystems wirkt.

10 39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des Repressors an Komponenten des Reportersystems durch weitere Agenzien reguliert werden kann.

15 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß in ein Reporterplasmid eine LacZ-Leu2 Genanordnung und die Repressor-Genanordnung integriert sind.

20 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Genanordnung für mindestens eine Rekombinase codiert und die Reportersysteme Rekombinationselemente enthalten.

25 42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekombinase über Rekombinationsprozesse mindestens ein Reportergen eliminiert oder invertiert.

30 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 oder 42, dadurch gekennzeichnet, daß die Rekombinase die sequenzspezifische Rekombinase Cre des Coliphagen ϕ 1 ist und das mindestens eine Reportergen flankierende lox P-Sequenzen als Rekombinationselemente aufweist.

35 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13 und 25 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß der

Transkriptionsregulator mindestens zwei Hybridproteine enthält, wobei die Hybridproteine von einer dritten Genanordnung codiert werden.

5 45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß ein erstes Hybridprotein ein Fusionsprotein aus einer DNA-Bindedomäne und einer ersten Proteinkomponente und ein zweites Hybridprotein ein Fusionsprodukt aus einer Aktivierungsdomäne des Transkriptionsregulators und einer zweiten Proteinkomponente ist, wobei durch Bindung zwischen den beiden Proteinkomponenten der aktive Transkriptionsregulator entsteht.

10 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß eine Einwirkung auf die Wechselwirkung der Hybridproteine über inhibitorische Komponenten erfolgt.

15 47. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens zwei Proteinkomponenten von einer fünften Genanordnung codiert werden.

20 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste Proteinkomponente einen Abschnitt, der mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente wechselwirkt, einen Abschnitt, der mit einem Transkriptionsfaktor wechselwirkt sowie einen inhibitorischen Abschnitt enthält, wobei erst nach Hemmung der Wechselwirkung der Bindung zwischen den mindestens zwei Proteinkomponenten die inhibitorisch wirkende erste Proteinkomponente die Expression des mindestens einen zweiten regulatorischen Faktors hemmt.

49. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine erste regulatorische Komponente ein Transkriptionsregulator oder Transkriptionsfaktor der Genanordnung des zweiten regulatorischen Faktors ist, der nach Inhibierung der Wechselwirkung mit der mindestens einen zweiten Proteinkomponente in seiner Aktivität reduziert oder inaktiviert wird, wodurch die Expression des zweiten regulatorischen Faktors gehemmt wird.

50. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß diese inhibitorischen Komponenten Naturstoffe wie Peptide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate oder andere chemische Substanzen sind.

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibitorischen Komponenten durch Mutagenese veränderte Bestandteile des mindestens einen ersten regulatorischen Faktors sind.

52. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine weitere vierte Genanordnung für die Expression von Peptiden bereitgestellt wird.

53. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46 und 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression des Repressor-Gens gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

55. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46 und 50 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.

56. Verfahren nach Anspruch 55, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Hybridproteine des Transkriptionsregulators die Expression der Rekombinase gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

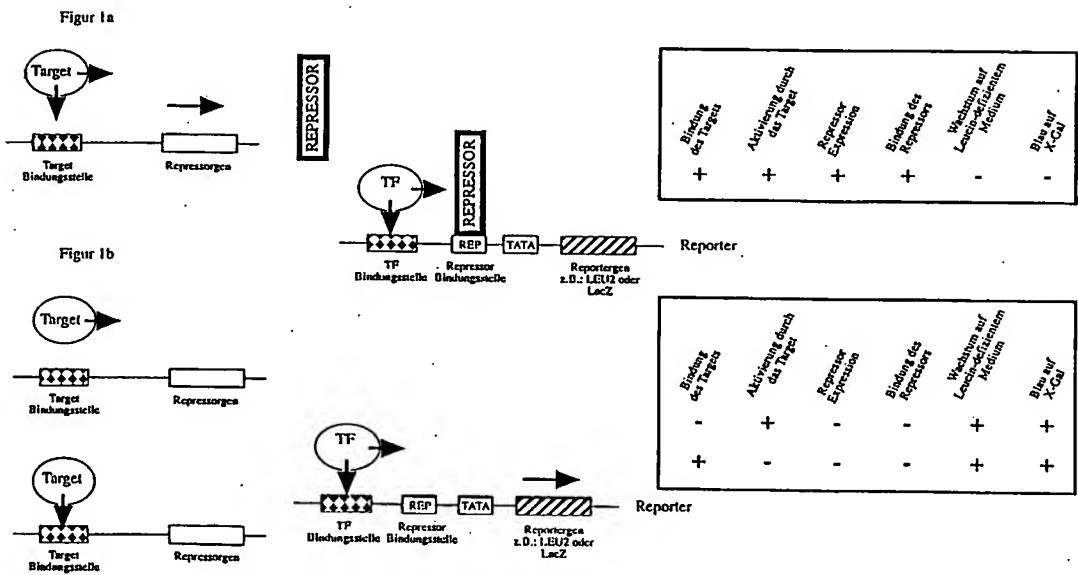
57. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24 und 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens eines Repressor-Gens gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

58. Verfahren nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression des Repressor-Gens gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.

59. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24 und 47 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß durch die

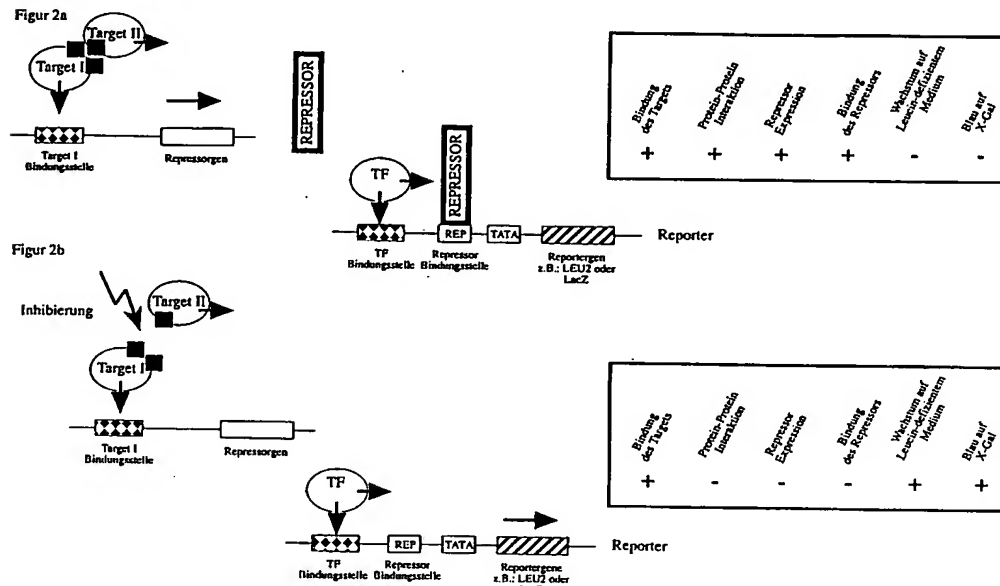
- Einwirkung auf die Wechselwirkung der mindestens zwei Proteinkomponenten die Expression mindestens einer Rekombinase gesteuert wird, wodurch eine Veränderung der Expression mindestens eines Reportergens erfolgt.
- Verfahren nach Anspruch 59, dadurch gekennzeichnet, daß durch Hemmung der Wechselwirkung der Proteinkomponenten die Expression der Rekombinase gehemmt wird und eine Expression des mindestens einen Reportergens erfolgt.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 41 bis 60, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Wirtsorganismus gleichzeitig Genanordnungen für mindestens einen Repressor und mindestens eine Rekombinase bereitgestellt werden.
- Verfahren nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, daß je nach eingestellten Versuchsbedingungen der Repressor oder die Rekombinase oder beide exprimiert werden.
- Verwendung eines der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 62 zur Ermittlung von inhibierenden Substanzen, die bevorzugt als Leitstrukturen einsetzbar sind.
- Verwendung nach Anspruch 63, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierenden Substanzen Peptide sind.
- Verwendung nach einem der Ansprüche 63 oder 64, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierenden Substanzen und Peptide zur Entwicklung von Therapeutika eingesetzt werden.

Transkriptionsstimulierende Targets im Repressor-abhängigen Verfahren



Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor abhängigen Verfahren

WO 95/20653

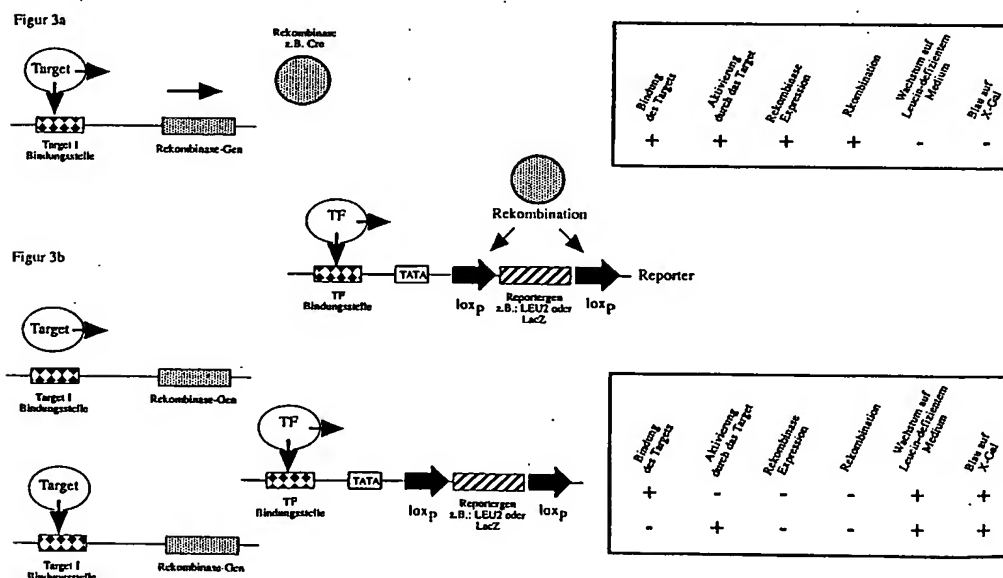


2/11

PCT/EP95/00297

Transkriptionsstimulierende Targets im Rekombinase-abhängigen Verfahren

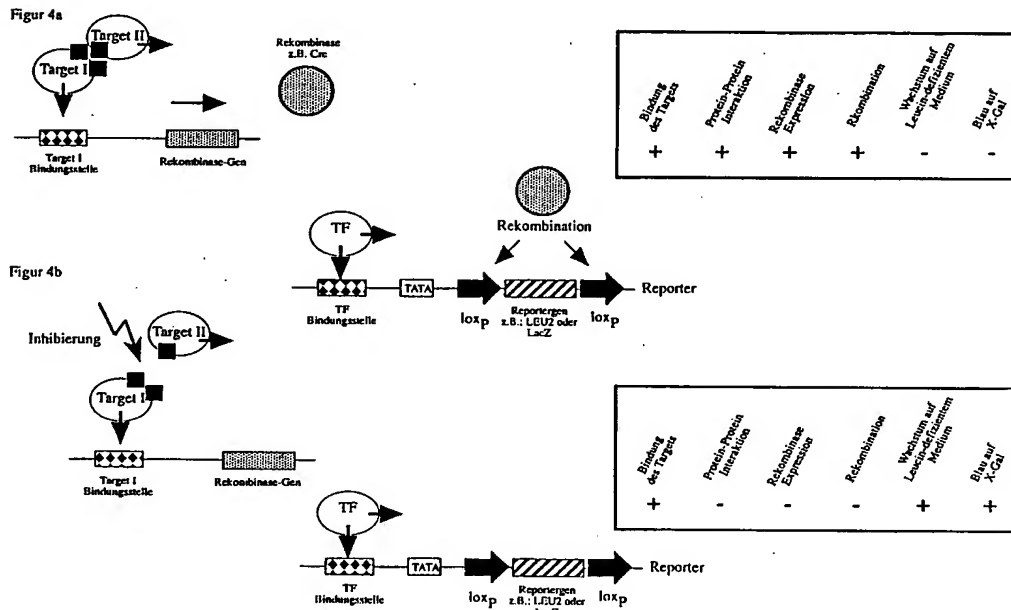
WO 95/20653



3/11

PCT/EP95/00297

Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

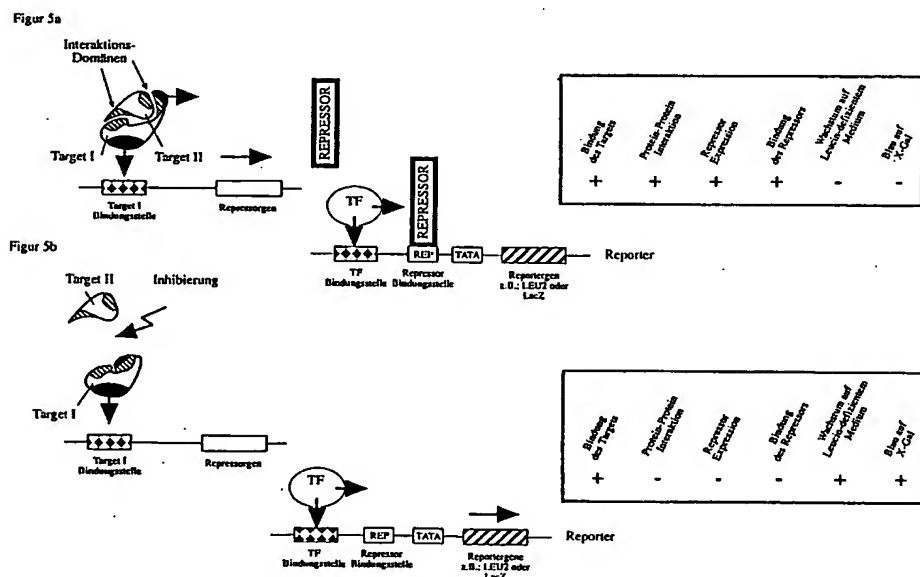


WO 95/20652

4/11

PCT/EP95/00297

Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor-abhängigen Verfahren



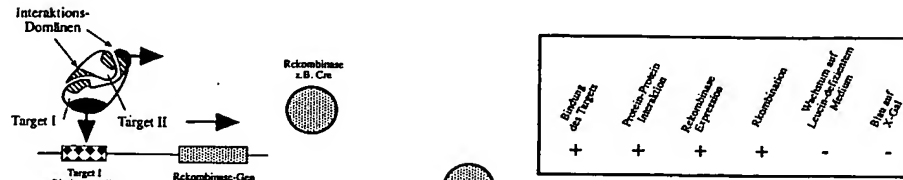
WO 95/20652

5/11

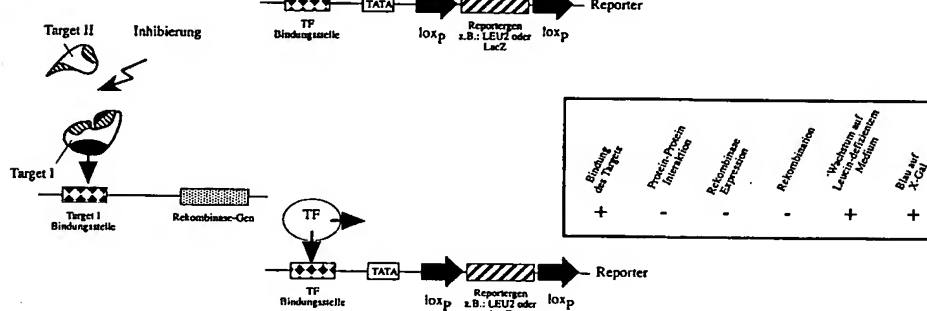
PCT/EP95/00297

Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

Figur 6a



Figur 6b

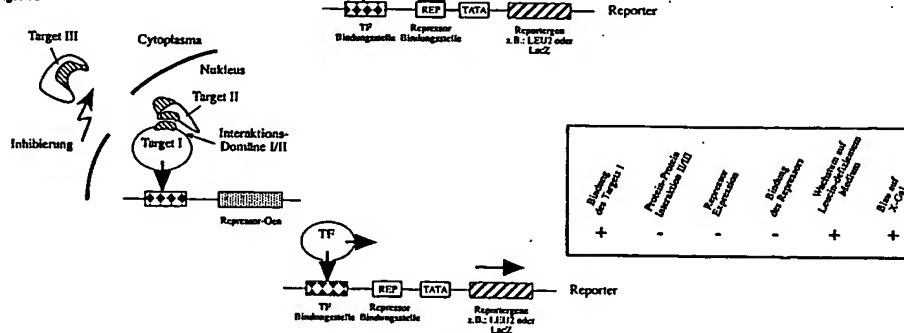


Protein-Protein Interaktionen als Target im Repressor-abhängigen Verfahren

Figur 7a



Figur 7b



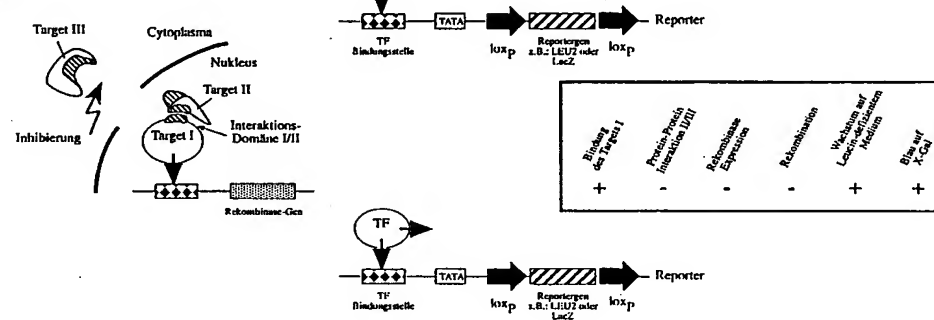
Protein-Protein Interaktion im Rekombinase-abhängigen Verfahren

WO 95/20653

Figur 8a



Figur 8b



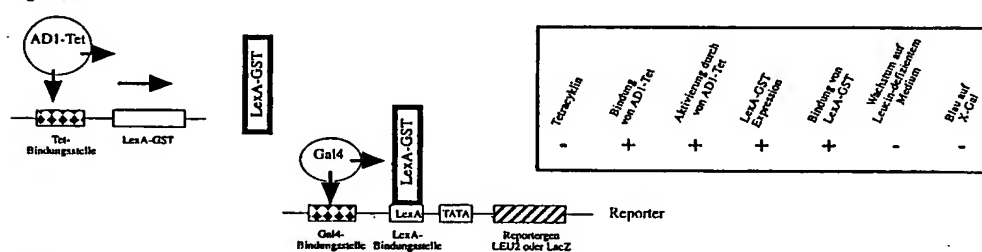
8/11

PCT/EP95/00297

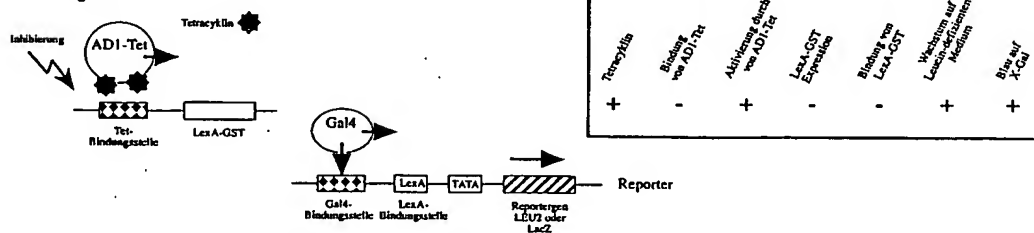
Repression des transkriptionsstimulierenden Targets AD1-Tet im Repressor-abhängigen Verfahren

WO 95/20653

Figur 9a



Figur 9b



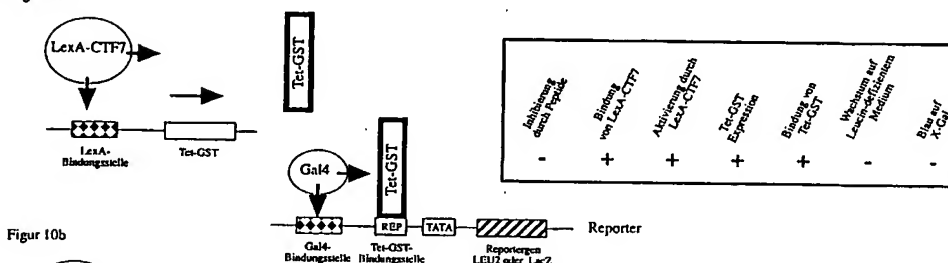
9/11

PCT/EP95/00297

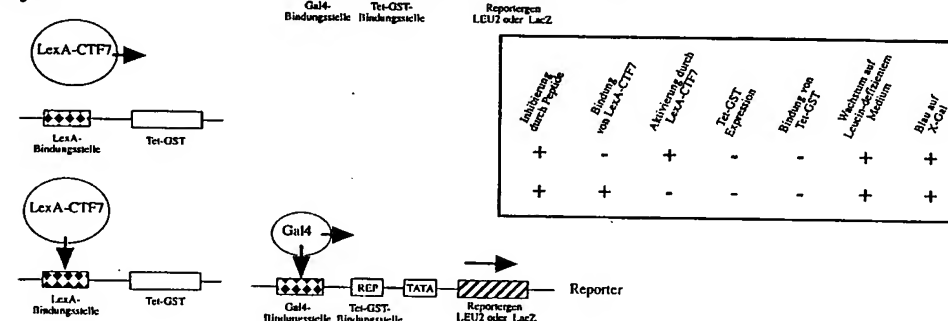
Repression des transkriptionsstimulierenden Targets LexA-CTF7 im Repressor-abhängigen Verfahren

WO 95/20652

Figur 10a



Figur 10b



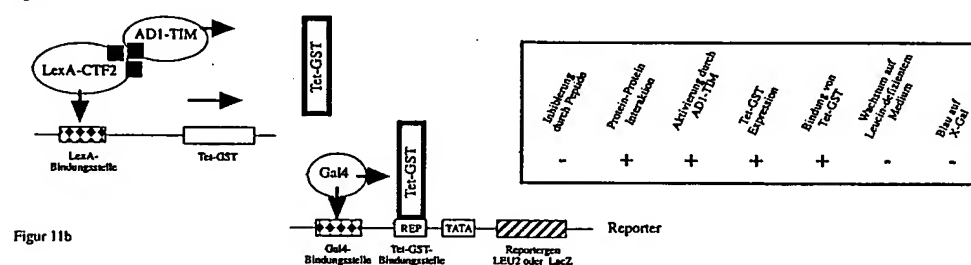
10/11

PCT/EP95/00297

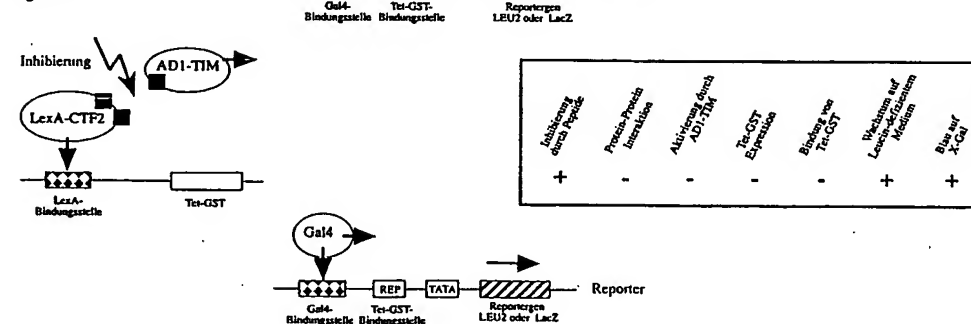
Repression der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen LexA-CTF2 und AD1-TIM im Repressor-abhängigen Verfahren

WO 95/20652

Figur 11a



Figur 11b



11/11

PCT/EP95/00297

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International A Jalon No
PCT/EP 95/00297A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/00 C12N15/67 C12N15/70 C12N15/81 C12Q1/68

B. FIELD(S) SEARCHED

IPC 6 C12N C12Q

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Category Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Referent to claim No.

X PROG. NATL. ACAD. SCI.,
vol. 89, no. 12, 15 June 1992 NATL. ACAD
SCI., WASHINGTON, DC, US.,
pages 5547-5553,
M. GOSSEN AND H. BLUMARD 'Tight control of
gene expression in mammalian cells by
tetracycline-responsive promoters',
see page 5548, right column, paragraph 4 -
page 5551, left column, paragraph 2

-/-

Special categories of cited documents:

X Patent documents are listed in the citation of text C.
X Patent family members are listed in column.

A. document defining the general state of the art which is not
prior art for the purposes of the present invention
B. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
C. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
D. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
E. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
F. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
G. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
H. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
I. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
J. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
K. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
L. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
M. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
N. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
O. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
P. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
Q. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
R. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
S. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
T. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
U. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
V. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
W. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
X. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
Y. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention
Z. document published on or after the international
filing date which may have priority over the present invention

Date of mailing of the international search report

04-07-1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 1
D-53000 Bonn, Germany
Tel. (+49-228) 304-3000, Fax (+49-228) 304-3001
Fax (+49-228) 304-3001

A national office

Hornig, H

Seite 1 von 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International A Jalon No
PCT/EP 95/00297

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Category Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Referent to claim No.

X THE PLANT JOURNAL,
vol. 2, no. 3, 1992 BLACKWELL, OXFORD, UK,
pages 397-404,
C. GATZ ET AL. 'Stringent repression and
homogeneous de-repression by tetracycline
of a modified CaMV 35S promoter in intact
transgenic tobacco plants',
see page 357, right column, line 36 - page
402, right column, paragraph 2

X MOLECULAR & GENERAL GENETICS,
vol. 227, no. 2, June 1991 SPRINGER
INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL,
pages 229-237,
C. GATZ ET AL. 'Regulation of a modified
CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet
repressor in transgenic tobacco
the whole document

X WO-A-91 16429 (GEN HOSPITAL CORP) 31
October 1991
see page 6, line 27 - page 26, line 2
the whole document

X WO-A-91 16456 (GEN HOSPITAL CORP) 31
October 1991
see page 4, line 10 - page 20, line 8;
claims 1-8

X WO-A-92 05286 (BRENT ROGER; GOLEMIS ERICA
(US); LECH KAREN F (US); ANDERSON CATHE) 2
April 1992
cited in the application
see page 12, line 1 - page 26, line 9;
claims 1-20; examples 1-6

Y

Y

Y

Y

Seite 2 von 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C(Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International A PCT/EP 95/00297	Class No
Category	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referent to claim No.	
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 86, no. 14, July 1989 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US., pages 5473-5477 G.W. BYRNE AND F.H. RUDDLE 'Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice' the whole document ---	29-49, 44-53, 57-58, 63-65	
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 88, no. 21, 1 November 1991 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US., pages 9578-9582 C.-T. CHIEN ET AL., 'The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest' the whole document ---	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65	
Y	SCIENCE, vol. 257, 31 July 1992 A.M.S. WASHINGTON, DC, US., pages 680-682 X. YANG ET AL., 'A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system' the whole document ---	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65	
Y	WO-A-93 10250 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27 May 1993 ---	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65	
Y	see page 11, line 1 - page 15, line 18 see page 26, line 16 - page 57, line 19 see claims 16-19 ---		
Y	WO-A-93 15227 (UNIV DUKE) 5 August 1993 ---	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65	
A	see page 5, line 22 - page 9, line 30; claims 15-35 ---		
	BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER 373 (9). 1992. 857. CODEN: BCHSEI ISSN: 0177-3593, ALTMANN H ET AL., 'Nuclear factor I a DNA-binding protein that can act as a transcriptional activator in yeast' Autumn meeting of the gesellschaft für biologische chemie (German society for biological chemistry), Rostock, Germany, September 24-26, 1992. ---	1-4, 25-27	

Form PCT/ISA/210 (Recommendation of revised claims) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C(Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International A PCT/EP 95/00297	Class No
Category	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referent to claim No.	
P, X	WO-A-94 04672 (DNX CORP.; BYRNE GUERARD (US)) 3 March 1994 the whole document ---	1-5, 10, 11, 14-17, 25-28	
P, X	WO-A-94 09133 (GEN HOSPITAL CORP) 28 Apr 11 1994 the whole document ---	1-5, 10-19, 23-28, 34, 36-39, 50	
P, X	see page 5, line 8 - page 26, line 19; claims 1-14 ---	1-5, 10-14, 33-39	
	WO-A-94 29442 (BASF AG.; BILJARD HERMANN (DE); GOSSEN MAHREDD (DE); SALFELD JOCHEN) 22 December 1994 the whole document -----		

Form PCT/ISA/210 (Recommendation of revised claims) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International A
PCT/EP 95/00297

Asian No

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116429	31-10-91	AU-A- 767691 EP-A- 0528827 US-A- 5322801	11-11-91 03-03-93 21-06-94
WO-A-9116456	31-10-91	AU-A- 7667191	11-11-91
WO-A-9205286	02-04-92	AU-B- 650677 AU-A- 8627291 CA-A- 2092000 CA-A- 1065092 CZ-A- 9300496 EP-A- 0550592 HU-A- 66827 JP-T- 6503713 ZA-A- 9107616	30-06-94 15-04-92 25-03-92 07-10-92 16-02-94 14-07-93 30-01-95 28-04-94 24-09-93
WO-A-9310250	27-05-93	CA-A- 2123906 EP-A- 0614491	27-05-93 14-09-94
WO-A-9315227	05-08-93	AU-B- 3609693	01-09-93
WO-A-9404672	03-03-94	AU-B- 5099393 CA-A- 2143326	15-03-94 03-03-94
WO-A-9409133	28-04-94	US-A- 5322801 AU-B- 5325594	21-06-94 09-05-94
WO-A-9429442	22-12-94	AU-B- 7108194	03-01-95

INTERNATIONAL RESEARCHER REPORT

International
PCT/EP 95/00297

Klassifizierung der Anmeldungsgegenstände

IPK 6 C12N15/00 C12N15/67 C12N15/70 C12N15/81 C12Q1/68

Nicht der internationalen Prioritätskategorie (IPK) oder auch der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

IPK 6 C12N C12Q

Recherchiere der nicht zum Mindestumfang gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die internationalen Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konzentrierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchgröße)

C. ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie | Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Bereich bezeichneten Teile | Ber. Ausgabet. Nr.

X PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 89, Nr. 12, 15 Juni 1992 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US.,
Seiten 5547-5551,
M. GOSSEN AND H. BUJARD 'Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters' siehe Seite 5548, rechte Spalte, Absatz 4 - Seite 5551, linke Spalte, Absatz 2

6-9,
29-40,
44-53,
57-58,
63-65

-/-☒ Weitere Veröffentlichungen und der Fassung von Teil C zu enthalten☒ Bitte Anfang Prioritätsliste

Besondere Kategorien von ausgedruckten Veröffentlichungen:
"A" - Veröffentlichungen, die sich auf internationale Anmeldungen oder auf dem Prioritätskategorie veröffentlicht werden ist und bei der Veröffentlichung der Prioritätskategorie veröffentlicht werden ist.
"B" - Andere Dokumente, die jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht werden ist.
"C" - Veröffentlichung, die jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht werden ist.
"D" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"E" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"F" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"G" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"H" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"I" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"J" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"K" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"L" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"M" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"N" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"O" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"P" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"Q" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"R" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"S" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"T" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"U" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"V" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"W" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"X" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"Y" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.
"Z" - Veröffentlichung, die sich auf eine internationale Offenlegung bezieht oder die eine internationale Offenlegung ist.

Datum der Abnahme der internationalen Recherche

Anmeldedatum der internationalen Recherche

04-07-1995

Name und Anschrift der internationalen Recherchebehörde
Bundesländer Patentamt, P.O. Box 1111, Pasadena 2
Tel. (+1-707) 460-5000, Fax (+1-707) 460-5010
Fax (+1-707) 460-5010Beauftragter Rechercheur
Hornig, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale
PCT/EP 95/00297

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Bereich kennzeichnende Teile	Der Anspruch Nr.
X	THE PLANT JOURNAL, Bd. 2, Nr. 3, 1992 BLACKWELL, OXFORD, UK, Seiten 397-404, C. GATZ ET AL. 'Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants' siehe Seite 357, rechte Spalte, Zeile 36 - Seite 402, rechte Spalte, Absatz 2	1-5, 25-28 6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	--- MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 227, Nr. 2, Juni 1991 SPRINGER INTERNATIONAL, AMSTERDAM, NL, Seiten 229-237, C. GATZ ET AL. 'Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the TnD-encoded Tet repressor in transgenic tobacco' the whole document	1-5, 25-28 6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	--- WO-A-91 16429 (GEN HOSPITAL CORP) 31. Oktober 1991, Zeile 27 - Seite 26, Zeile 2 the whole document	1-5, 50 6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	--- WO-A-91 16456 (GEN HOSPITAL CORP) 31. Oktober 1991 siehe Seite 4, Zeile 10 - Seite 20, Zeile 8; Ansprüche 1-8	1-5, 50 6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
X	--- WO-A-92 05286 (BRENT ROGER; GOLENTS ERICA (US); LECH KAREN F (US); ANDERSON CATHE) 2. April 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 12, Zeile 1 - Seite 26, Zeile 9; Ansprüche 1-20; Beispiele 1-6	1-5, 50 6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	---	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65

Publiziert PCT/DA/9218 (Erfindung von Blatt 2) (Juni 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale
PCT/EP 95/00297

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Bereich kennzeichnende Teile	Der Anspruch Nr.
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 86, Nr. 14, Juli 1989 NATL. ACAD SCI. WASHINGTON DC, US., Seiten 5473-5477, G.W. BRINK AND F.H. RUDDLE 'Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	--- PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 88, Nr. 21, 1. November 1991 NATL. ACAD SCI. WASHINGTON DC, US., Seiten 9578-9582, C.-I. CHIEN ET AL. 'The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	--- SCIENCE, Bd. 257, 31. Juli 1992 AAAS, WASHINGTON DC, US., Seiten 680-682, X. YANG ET AL. 'A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system' the whole document	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	--- WO-A-93 10250 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 27. Mai 1993 siehe Seite 11, Zeile 1 - Seite 15, Zeile 18 siehe Seite 26, Zeile 16 - Seite 57, Zeile 19 siehe Ansprüche 16-19	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65
Y	--- WO-A-93 15227 (UNIV DUKE) 5. August 1993 siehe Seite 5, Zeile 22 - Seite 9, Zeile 30; Ansprüche 15-35	6-9, 29-40, 44-53, 57-58, 63-65

Publiziert PCT/DA/9218 (Erfindung von Blatt 2) (Juni 1992)

